REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE l'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE & DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DES MICRORGANISMES BENEFIQUES DES ALIMENTS
FONCTIONNLLES ET DE LA SANTE

THESE DE DOCTORAT en SCIENCES

Domaine: Sciences de la Nature & de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Nutrition et Santé

THEME

Dépollution des eaux urbaines par les nanochitosanes et les biofilms

Presentée
Par

RAHALI Abdallah

Soutenue le 12/12/2020 devant le jury d'examen composé de:

Président :	Pr Belhakem Mostefa	Univ. Mostaganem
Directeur de thèse :	Pr Riazi Ali	Univ. Mostaganem
Examinateurs :	Pr Boucherit Kebir	Univ. Tlemcen
	Pr Benderdouche Noureddine	Univ. Mostaganem
	Dr Tefiani Choukri (MCA)	Univ. Tlemcen
	Pr Abbouni Bouziane	Univ.Sidi Belabes

Année universitaire : 2019-2020

Dédicace

En guise de reconnaissance envers mon DIEU le tout puissant

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde, mes parents, qui m'ont permis de poursuivre mes études dans les meilleurs conditions, m'ont inculqué les valeurs inculqué les valeurs nobles de la vie et m'ont appris le sens du travail, l'honnêteté et de la responsabilité.

A ma femme et ma petite fille.

A mes frères.

A mes amis et mes collègues.

A tous ceux qui aiment la science.

Je dédie ce modeste travail.

Abdallah Rahali

Mostaganem Septembre 2020

Avant propos

La presente thèse a été realisée dans sa majeure partie au sein du Laboratoire des Microorganismes Benefiques, des Aliments Fonctionneles et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem dirigé par le Pr Riazi Ali, et pour certaines manipulations, au niveau du laboratoire d'oxydation chimique du departement d'ingénierie de l'environnement, Université technique de GEBZE (Turquie).

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Mr Riazi Ali, professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, pour l'encadrement qu'il m'a assuré du magister jusqu'au doctorat, pour la confiance qu'il m'a accordé, pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique. Merci pour la grande liberté que vous m'avez laissée afin de réaliser ce travail. Je tiens à lui exprimer ma profonfe gratitude pour ses conseils, pour son intérêt porté à mon sujet, son aide morale et la mise à ma disposition de tous ses moyens afin de mener à bien ce travail.

C'est un grand honneur pour moi que le jury de cette thèse soit présidé, non seulement, par un spécialiste en chimie organique, mais aussi et surtout par notre Recteur, le Professeur Belhakem Mostefa, auquel j'exprime tous mes respects et vifs remerciements d'avoir accepté de nous accorder ce temps de soutenance malgré l'énorme responsabilité qu'il assure. Je vous suis très reconnaissant pour l'intérêt que vous portez à mon travail que votre présence valorisera sans aucun doute.

Je suis doublement honoré par la présence à mon jury du Mr Boucherit Kebir, Professeur en Biologie et Recteur de l'université Abou Bekr Bekaid de Tlemcen, qui a aimablement accepté d'apporter sa pierre à la maturation de cette expérience en examinant

ce travail nonobstant les multiples responsabilités qui sont les siennes. Je vous exprime toute ma gratitude, mes respects et ma reconnaissance.

J'adresse toute ma reconnaissance à Mr Benderdouche Nouredine, professeur spécialiste en génie des procédés (traitement des eaux) à l'université Abdelhamid Ibn Badis a Mostaganem et Vice Recteur de la formation supérieure de troisiàme cycle, l'habilitation universitaire, la recherche scientifique et la formation supérieure de post-graduation ; pour m'avoir honoré en acceptant de valoriser ce travail par ses critiques en tant que spécialiste en génie des procédés (traitement des eaux);et ce, en dépit de la grande responsabilité administrative qui lui incombe .

Ma gratitude s'adresse à Monsieur Abbouni Bouziane, Professeur en microbiologie à l'université de Sidi Bel-Abes, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie également M Tefiani Choukri, Maître de conférences classe A à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour sa participation à mon jury de thèse et pour avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques constructives sur l'aspect microbiologique de ce travail.

Mes remerciements les plus forts sont adressés a Nihal Bektas professeur a la faculté d'ingenierie de l'environnement à l'Universite de Gebze (Turquie), pour avoir accepté de m'acueillir dans son laboratoire de recherche. Je la remercie pour sa grande gentillesse et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens pour realiser mes experiences, la caracterisation des adsorbants utilisés lors de cette thése particullierement.

Je voudrais egalement remercier toutes les personnes rencontrées dans le laboratoire d'oxydation chimique (Turquie) particulierment Mr Mesut Tekbaş et M^{elle}Gizem Başaran Dindaş pour leur aide.

Je ne saurais oublier de remercier mon ami, Kamel Boubakri, Maître assistant a l'université Yahia Fares à Medea et chercheur associé au centre de recherche sur les bacteries lactiques en Argentine pour son aide et l'attention qu'il a bien voulu accorder au séquençage des bacteries isolées .

Je salue et remercie mes amis du laboratoire LMBAFS, notament Mr Moussaoui Badreddine, pour son encouragement et ses precieux conseils et son aide morale, sans oublier Mme Hamed Djahira, ingénieure du laboratoire LMBAFS, pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de cette thèse.

Enfin, ce travail est le fruit de longues années d'études auxquelles l'amour et le soutien inconditionnel de ma famille ont largement contribué.

Mostaganem, septembre 2020
Abdallah Rahali

Résumé

Les rejets des industries du textile et les eaux usées urbaines drainent de grandes quantités de colorants et de métaux lourds qui représentent un risque potentiel de santé publique. L'objectif de cette étude c'est de proposer un traitement d'assainissement de ces eaux basé sur l'utilisation de nanochitosanes issus de chitine extraite des déchets de crevettes (carapaces) et de biofilms élaborés avec des souches bactériennes isolées localement à partir de criquet pèlerin. Le principe de cette dépollution des eaux repose sur le phénomène de l'adsorption. La méthodologie adoptée a consisté à analyser le chitosane par microscopie électronique à balayage, par infra rouge de Fourier, en déterminant le degré de désacétylation et le potentiel zéro ; identifier par PCR les souches isolées et évaluer leur capacité à produire des exopolysaccharides générateurs de biofilms. Les biomatériaux préparés ont été testés pour leur pouvoir d'adsorption de colorants (rouge congo, bleu de méthylène) et de métaux lourds (nickel, cobalt) en fonction du temps, du pH et de la concentration en ces polluants dont la cinétique d'adsoprtion a été suivie selon le pseudo premier et second ordre, ainsi que selon le modèle de diffusion intraparticulaire. Les résultats obtenus indiquent que l'élimination des polluants est très efficace et rapide dans les 30 premières minutes, avec des pH optimaux d'adsorption du bleu de méthylène et du rouge congo par le chitosane égaux à 4 et à 6, respectivement ; tandis que l'élimination du nickel par le nanochitosane est meilleure à pH 9. L'étude de la cinétique d'adsorption a montré que le processus d'adsorption s'effectue selon le modèle pseudo second ordre pour tous les polluants. Les isothermes d'adsorption de Freundlich et de Langmuir ont permis de décrire le phénomène d'adsorption des polluants qui ont été quasi totalement éliminés. En conclusion, il apparaît que le chitosane, le nanochitosane et les biofilms sont efficaces pour l'adsorption des colorants et des métaux lourds. L'ensemble des observations faites dans ce travail constituent un argument en faveur de l'utilisation de biomatériaux locaux sans valeur marchande pour l'assainissement des eaux usées urbaines.

Mots clés : Adsorption, biofilms, chitosane, nanochitosane, eaux usées, dépollution.

Abstract

Discharges from textile industries and urban wastewater drain large amounts of dyes and heavy metals which represent a potential public health risk. The objective of this study is to propose a sanitation treatment of these waters based on the use of nanochitosans from chitin extracted from shrimp waste (shells) and biofilms produced with locally isolated bacterial strains from Desert Locust. The principle of this water depollution is based on the phenomenon of adsorption. The methodology adopted consisted in analyzing the chitosan by scanning electron microscopy, Fourier infrared, determining the degree of deacetylation and the zero potential; identify by PCR the isolated strains and evaluate their capacity to produce exopolysaccharides which generate biofilms. The biomaterials prepared were tested for their adsorption power of dyes (congo red, methylene blue) and heavy metals (nickel, cobalt) as a function of time, pH and concentration of these pollutants for which the kinetics of adsorption was monitored according to the pseudo first and second order, as well as according to the intraparticle diffusion model. The obtained results indicate that the removal of pollutants is very efficient and rapid in the first 30 minutes, with optimal pH for absorption of methylene blue and Congo red by chitosan equal to 4 and 6, respectively; while the elimination of nickel by nanochitosan is better at pH 9. The study of the adsorption kinetics has shown that the adsorption process takes place according to the pseudo second order model for all pollutants. The Freundlich and Langmuir adsorption isotherms have made it possible to describe the phenomenon of adsorption of pollutants which have been almost completely eliminated. In conclusion, it appears that chitosan, nanochitosan and biofilms are effective for the adsorption of dyes and heavy metals. All the observations made in this work are in favor of the use of local biomaterials with no market value for urban wastewater treatment.

Keywords: Adsorption, biofilms, chitosan, nanochitosan, wastewater, depollution.

ملخص

تصريفات صناعات النسيج ومياه الصرف الصحي الحضرية تستنزف كميات كبيرة من الأصباغ والمعادن الثقيلة التي تمثل مخاطر محتملة على الصحة العامة. الهدف من هذه الدراسة هو اقتراح معالجة الصرف الصحي لهذه المياه على أساس استخدام النانوكيتوزان من الكيتين المستخرج من نفايات الجمبري (الأصداف) والأغشية الحيوية المنتجة من سلالات بكتيرية معزولة محليًا من الجراد الصحراوي. مبدأ إزالة تلوث الماء هذا يقوم على ظاهرة الادمصاص. المنهجية المعتمدة تتكون من تحليل الكيتوزان عن طريق المسح المجهري الإلكتروني ، الأشعة تحت الحمراء فورييه ، وتحديد درجة نزع الأتلة والجهد الصفري. تحديد السلالات المعزولة بواسطة PCR وتقييم قدرتها على إنتاج السكريات الخارجية التي تولد الأغشية الحيوية. تم اختبار المواد الحيوية المحضرة لقدرتها على ادمصاص الأصباغ (الأحمر الكونغولي ، والأزرق الميثيلين) والمعادن الثقيلة (النيكل ، والكوبالت) كدالة للوقت ، ودرجة الحموضة وتركيز هذه الملوثات التي تم رصد حركية الادمصاص وفقًا لها. الترتيب الأول والثاني ، وكذلك وفقًا لنموذج الانتشار داخل الجسيمات. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن إزالة الملوثات كانت فعالة وسريعة للغاية في أول 30 دقيقة ، مع درجة حموضة مثالية لادمصاص الميثيلين الأزرق وأحمر الكونغو بواسطة الكيتوزان يساوي 4 و 6 على التوالي ؛ بينما يكون التخلص من النيكل بواسطة النانو شيتوزان أفضل عند درجة الحموضة 9. وقد أظهرت دراسة حركية الادمصاص أن عملية الادمصاص تتم وفقًا لنموذج الدرجة الثانية الزائف لجميع الملوثات. جعلت متساويات الادمصاص فروندليشولونقميرمن الممكن وصف ظاهرة امتزاز الملوثات التي تم القضاء عليها بالكامل تقريبًا. في الختام ، يبدو أن الشيتوزان والنانوكيتوزان والأغشية الحيوية فعالة لامتصاص الأصباغ والمعادن الثقيلة. جميع الملاحظات التي تم إجراؤها في هذا العمل لصالح استخدام المواد الحيوية المحلية التي ليس لها قيمة سوقية لمعالجة مياه الصرف الصحي في المناطق الحضرية.

الكلمات المفتاحية: الادمصاص ، الأغشية الحيوية ، الشيتوزان ، النانوكيتوزان ، مياه الصرف الصحي ، إزالة التلوث.

Liste des abréviations

BM : Bleu de méthylène

C_0 : La concentration initiale de soluté ($mg.L^{-1}$)

DA : degré d'acétylation

DDA : degré de desacetylation

EDS : Spectroscopie dispersive de rayons X

FTIR : Spectroscopie infra rouge de Fourier

ICP : Spectrophotométrie a plasma a couplage inductif

k'_2 : la constante de vitesse pour le modèle de pseudo-deuxième ordre ($g.mg^{-1}.min^{-1}$)

K_f et 1/n: constantes de Freundlich caractéristiques de l'efficacité d'un adsorbant

k_i : est la constante de vitesse intra-particulaire ($mg.g^{-1}.min^{1/2}$).

K_L : Paramètre de Langmuir(l/mg)

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

m : La masse de l'adsorbant

pH_{pzc} : pH du point de charge zéro

Q_m : est la capacité d'adsorption la plus élevée ($mg.g^{-1}$)

Q_e: La quantité adsorbée a l'équilibre

Q_{max}: La capacité maximale d'adsorption ($mg.g^{-1}$)

RC : Rouge congo

S10 : Sphingomonas sp

S13 : Sphingomonas echinoides

V : Volume

Liste des tableaux

Tableau 1 : Norme tunisienne (NT 106.02) des rejets d'effluents…….... 5
Tableau 2: Polluants des eaux usées et leurs sources……... 9
Tableau 3: Exemples de polluants retrouvés dans les trois grandes sources de pollution……. 9
Tableau 4: Principaux groupes chromophores et auxochromes, classés par intensité croissante…….. 13
Tableau 5 : Les procédés de traitement utilisés et opérations unitaires associées …….. 20
Tableau 6: Sources potentielles de chitine ..…….. 30
Tableau 7: Applications du chitosane…….. 34
Tableau 8 : Applications du chtisoane dans le domaine agricole……. 36
Tableau 9: Les applications du chitosane dans le domaine de l'environnement…….. 37
Tableau 10: Principaux constituants de la matrice du biofilm……. 40
Tableau 11: Les constantes isothermes et les coefficients de corrélation des modèles isothermes utilisés……. 71
Tableau 12: Comparaison des capacités d'adsorption maximales (Qm) de CR et MB sur différents adsorbants…… 74
Tableau 13: Les constantes cinétiques et les coefficients de corrélation calculés…….. 74
Tableau 14: Les constantes et les coefficients de corrélation de la diffusion intraparticulaire……. 76
Tableau 15: Les coefficients de corrélation et les constants des modèles d'isothermes utilisés…… 88
Tableau 16: Les coefficients de corrélation et les constantes de la cinétique d'adsorption du nickel par le nanochitosane…….. 88
Tableau 17: Les constantes et les coefficients de corrélation de la diffusion intra particulaire……. 89
Tableau 18 : La teneur de production des exopolysaccharides par les souches isolées……. 94

.

Liste des figures

Figure 1: les differentes classes de colorants : (A)colorant azoiques ,(B) colorants anthraquinoniques ,(C)colorants indigoïdes ,(D)colorants xanthène ,(E)phtalocyanines ,(F)colorants nitrés et nitrosés ,(G)colorants triphénylméthan …… 15

Figure 2: Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau……..… 16

Figure 3: Comparaison des structures de la chitine, du chitosane et de cellulose … 26

Figure 4: Méthode de production du chitosane…….……. 27

Figure 5 : La desacétylation enzymatique de la chitine……. 29

Figure 6: Les unités de répétitions structurales de la chitine et du chtiosane…… 31

Figure 7: Cycle de développement simplifié d'un biofilm ..……..… 42

Figure 8: Préparation du chitosane à partir les carapaces du crevette…… 48

Figure 9: L'espèce L'espèce*Criquet pèlerin* utilisée pour l'isolement des sphingomonas…… 50

Figure 10 : Diagramme d'extraction de l'ADN génomique avec le Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)…… 52

Figure 11: Schéma de configuration expérimentale d'adsorption par lots utilisé **.....** 56

Figure12: Spectroscopie FT-IR de chitosane. …… 62

Figure 13: Potentiel zeta de chitosane en function de pH…….. 63

Figure.14: Micrographe MEB de chitosane préparé avec différents grossissement… 65

Figure15: Les spectres EDS et les éléments trouvés a la surface de chitosane……... 65

Figure16: Effet de temps de contacte sur l'adsorption de BM et RC par l'utilisation de chitosane……. 67

Figure17: Effet de pH sur l'adsorption de BM et RC par le chitosane…….. 67

Figure 18: Effet de la masse d'adsorbant sur l'adsorption de méthylène bleu et rouge congo…… 70

Figure19: Effet de la concentration initiale des colorants sur l'adsorption de MB et RC par le chitosane…….. 70

Figure 20: Représentation graphique de l'équilibre d'adsorption pour les colorants BM et RC……. 71

Figure 21 : Isotherme d'adsorption de Langmuir pour les colorants BM et RC……. 73

Figure 22: Isotherme d'adsorption de freundlich pour les colorants BM et RC……. 73

Figure 23 : Modèle de diffusion intra-particulaire de l'adsorption de bleu de méthylène et rouge de congo……. 76

Figure 24 : Les spectres infra rouge de Fourrier (FTIR) du nanochitosane avant et après l'adsorption de nickel(II)…… 77

Figure 25: Potentiel zêta du nanochitosane……. 80

Figure 26 : Micrographe MEB de nanochitosan avant adsorption (A et B) et après adsorption (C et D)du nickel……. 80

Figure 27 : Spectres EDS et les éléments de surface trouvés sur le nanochitosane avant et après l'adsorption…… 82

Figure 28: Effet du temps de contact dans l'adsorption du Nickel(II) par le nanochitosane……. 82

Figure 29 : Effet du pH de la solution de nickel sur l'adsorption du Nickel(II) par le nanochitosane…… 84

Figure 30: Effet de la concentration initiale en nickel sur l'adsorption du Ni(II) par le nanochitosane…….. 84

Figure 31: Effet de la température sur l'adsorption du Ni(II) par le nanochitosane… 86

Figure 32: Régénération de nanochitosane dans l'adsorption de Ni(II)……. 86

Figure 33 : Isotherme d'adsorption du Ni(II) de Langmuir et de Freundlich……. 88

Figure 34: Modèle de diffusion intra-particulaire d'adsorption du Nickl(II)……. 89

Figure 35: Coloration du GRAM des souches utilisées…….. 90

Figure 36: Séquençage de la souche S10……. 92

Figure 37: Séquençage de la souche S13…… 92

Figure 38: Courbe d'étalonnage de glucose……. 94

Figure 39 : Elimination du nickel par *Sphingomonas sp.* et *Sphingomonas echinoides*…… 97

Figure 40: Elimination du cobalt par les deux souches *Sphingomonas* sp. et S*phingomonas echinoides*……. 97

Figure 41: Les spectres infra rouge de la souche S13 avant l'adsorption du nickel et du cobalt (A); après l'adsorption du cobalt (B) et et du nickel (C)……. 98

Figure 42: les spectres infrarouge de la souche S10 : avant l'adsorption (A); après l'adsorption (B) et (C) de cobalt et de nickel, respectivement…… 98

Figure 43: Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) des deux souches *Sphingomonas* : (A) S10 avant adsorption , (B) S13 avant adsorption , (C) S10 après formation de biofilm et adsorption , (D) S13 après formation debiofilm et adsorption……. 99

Sommaire

Dédicace
Avant propos
Résumé
Abstract
Liste des abréviations
Liste des tableaux et des figures
Sommaire
Introduction…… 1
Chapitre I: Généralités sur la pollution de l'eau et les procédés de traitement des eaux usées chargés en colorants et en métaux lourds
I.1. La pollution de l'eau…… 4
I.1.1. Définition…… 4
I.1.2. Législation en matière de pollution …… 5
I.1.3. Différents types de pollution…… 5
I.1.3.1.Selon l'origine des substances polluantes…… 5
I.1.3.1.1. Pollution domestique et urbaine…… 6
I.1.3.1.2. Pollution industrielle…… 6
I.1.3.1.3. Pollution agricole …… 6
I.1.3.1.4. Pollution naturelle…… 7
I.1.3.2. Selon la nature des pollutants…… 7
I.1.3.2.1.Pollution physique…… 7
I.1.3.2.2.Pollution chimique…… 7
I.1.3.2.3.Pollution biologique …… 8
I.1.4. Les facteurs de pollution …… 8
I.1.5. Différents types de polluants…… 10
I.1.5.1. Les colorants…… 11
I.1.5.1.1. Les différentes classes de colorants…… 12

I.1.5.1.1.1.Les colorants azoïques…… 13
I.1.5.1.1.2. Les colorants anthraquinoniques…….. 13
I.1.5.1.1.3. Les colorants indigoïdes ……..…….... 14
I.1.5.1.1.4. Les colorants xanthène……..…….... 14
I.1.5.1.1.5. Les phtalocyanines……..……. 14
I.1.5.1.1.6. Les colorants nitrés et nitrosés…….…… 14
I.1.5.1.1.7. Les colorants triphénylméthanes…….……. 14
I.1.5.1.2. Les colorants et leurs impacts environnementaux……..... 15
I.1.5.1.3. Toxicité des colorants……...…….. 16
I.1.5.2. Les métaux lourds…….…… 18
I.1.5.2.1. Définition…….…… 18
I.1.5.2.2. Les sources de métaux lourds …….…… 18
I.1.5.2.2.1.Source naturelle ……..…….. 18
I.1.5.2.2.2. Sources liées à l'activité humaine…….... 19
I.1.5.2.3. La toxicité des métaux lourds …… 19
I.2. Les procédés de traitements des eaux usées chargées en colorants et en métaux lourds…… 19
I.2.1. Procédés chimiques…….…….. 19
I.2.1.1. La précipitation des hydroxydes métalliques …… 19
I.2.1.2. Les procédés d'oxydation classique …….…… 20
I.2.1.3. Les procédés d'oxydation avancée (POA)……..…….. 21
I.2.2. Procédés physicochimiques ……..…… 21
I.2.2.1. La coagulation-floculation……. 21
I.2.2.2. Les techniques membranaires……...……. 22
1.2.2.2.1. l 'hémodialyse ……. 22
1.2.2.2.2. l'électrodialyse …… 22
I.2.2.3. L'échange d'ions……. 22
I.2.2.4. L'adsorption…….…… 23
I.2.3. Bioprocédés……...…… 23
I.2.3.1.Traitement aérobie…….……. 24
I. 2.3.2.Traitement anaérobie……. 24
I.2.3.3. Matériaux utilisés dans les bioprocédés……. 24

I.2.3.3.1. Le chitosane et la chitine …… 24
I.2.3.3.1.1. Origine du chitosane …… 24
I.2.3.3.1.2.Structure moléculaire comparée de la chitine, du chitosane et de la cellulose 25
I.2.3.3.1.3. Elaboration du chitosane……..…… 26
I.2.3.3.1.4. Valorisation et traitement de la chitine brute……..……. 28
I.2.3.3.1. 4.1. La déminéralisation …….. 28
I.2.3.3.1. 4.2. La déprotéinisation…… 28
I.2.3.3.1.4.3. La décoloration……... 28
I.2.3.3.1. 4.4. La désacétylation ……. 28
I.2.3.3.1.5. Les principales sources de chitine……..……. 29
I.2.3.3.1.6. Caracteristiques physico-chimiques du chitosane……... 30
I .2.3.3.1.6.1. Les degrés de désacétylation et d'acetylation ……..… 30
I.2.3.3.1.6.2. La viscosité…… 32
I.2.3.3.1.6.3. La cristallinité…… 32
I.2.3.3.1.6.4. Le poids Moléculaire……...……. 33
I.2.3.3.1.6.5. La solubilité ……. 33
I.2.3.3.1.7. Domaines d'utilisation du chitosane……...….. 34
I.2.3.3.1.7.1. Biomédicale ……..…… 35
I.2.3.3.1.7. 2. Cosmétique ……..…… 35
I.2.3.3.1.7. 3. Agriculture ……..…… 36
I.2.3.3.1.7.4. Traitement des eaux……..……. 36
I.2.3.3.2. Les biofilms …… 38
I.2.3.3.2.1. Définition et historique……. 38
I.2.3.3.2.2. Composition du biofilm ……..…….. 39
I.2.3.3.2.3. Formation des biofilms et facteurs d'influence…… 40
I.2.3.1.2.3.1. Formation des biofilms……..…… 40
I.2.3.1.2.3.2. Les facteurs influençant la formation du biofilm……... 42
I.2.3.3.2.3.2.1. La surface ……..……. 43
I.2.3.3.2.3.2.2. Les caractéristiques du milieu……...…….. 43
I.2.3.3.2.3.2.3. Les propriétés des cellules……..…… 43
I.2.3.3.2.4. Les biofilms dans le traitement des eaux usées……..…… 43

Chapitre II: Matériels et Méthodes

II.1. Matériels ……. 46
II.1.1. Matériel biologique ……...…….. 46
II.1.1.1. La carapace de crevette comme source de chitine……. 46
II.1.1.2. Le criquet pèlerin comme source de prélèvement des souches bactériennes … 46
II.1.2. Matériel d'analyse ……...…… 46
II.1.2.1. Solvants et réactifs utilisés ……....…… 46
II.1.2.2. Appareillage …….. 46
II.2. Méthodes…….……. 47
II.2.1. Extraction de la chitine et préparation du chitosane ……. 47
II.2.2. Préparation du nanochitosane à partir de la chitine……. 49
II.2.3. Isolement et identification des souches bactériennes à partir du criquet Pèlerin… 49
II.2.3.1.Isolement des bactéries *sphingomonas* et conservation des isolats…… 49
II.2.3.2.Observation de l'aspect phenotypique des sphingomonas……. 50
II.2.3.3. Méthode d'identification moléculaire des souches isolées. …….. 50
II.2.3.3.1. Extraction de l'ADN ……. 50
II.2.3.3.2. PCR Universelle……. 51
II. 2.3.3.3. Séquençage …… 51
II.2.4. Evaluation du pouvoir de production d'exopolysaccharides par les souches isolées 51
II.2.5. Technique d'élaboration des biofilms……..… 53
II.2.6. Méthodes de caractérisation du chitosane et des biofilms……. 53
II.2.6.1. Détermination du degré de désacétylation du chitosane…… 53
II.2.6.2.Méthode à l'infrarouge de Fourier (FTIR): Fourier Transform Infrared Spectroscopy)……. 54
II.2.6.3. Technique de microscopie Electronique à Balayage Energy Dispersive Spectroscopy (MEB- EDS) ……..... 54
II.2.6.4. Méthode de détermination du potentiel Zêta ou potentiel zéro ……. 55
II.2.7.Détermination du pouvoir d'adsorption de colorants et de métaux lourds par les biomatériaux préparés ……. …… 55
II.2.7.1.Adsorption du bleu de méthylène et du rouge Congo par le chitosane ……. 55
II.2.7.2. Adsorption de nickel par le chitosane et le nanochitosane…… 57

II.2.7.3. Adsorption de Nickel et de cobalt par les biofilms des souches isolées…… 57
II.2.8. Cinétique d'adsorption…….. 58
II.2.8.1. Pseudo-premier ordre……. 58
II.2.8.2.Pseudo-second ordre…… 58

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Pouvoir adsorbant du chitosane vis-a-vis du bleu de méthylene et du rouge Congo …….. 61
III.1.1. Caracterisation physic-chimique du chitosane …… 61
III.1.1.1.Résultats d'analyse par FTIR …….. 61
III.1.1.2. Nature du potentiel zêta du chitosane……. 62
III.1.1.3. Résultat d'analyse par MEB-EDS ……. 64
III.1.1.4. Degré de désacétylation du chitosane……..…….. 64
III.1.2. Facteurs d'influence du pouvoir adsorbant du chitosane…….…….. 66
III.1.2.1. Facteur temps……...…… 66
III.1.2.2. Facteur pH…… 66
III.1.2.3. Facteur dose d'adsorbant…….. 68
III.1.2.4. Facteur charge initiale en colorants……. 68
III.1.3. Allure des isothermes d'adsorption…….…… 69
III.1.4. Particularités de la cinétique d'adsorption……. 72
III.1.4.1. Selon le modèle pseudo premier et second ordre…….…… 72
III.1.4.2. Selon la diffusion intra particulaire…….……. 75
III.2. Pouvoir d'adsorption du nanochitosane vis-à-vis du nickel…….……. 75
III.2.1. Caractérisation physico-chimique du nanochitosane…….…… 75
III.2.1.1. Résultat d'analyse comparée par la FTIR avant et après adsorption……. 75
III.2.1.2. Etat du potentiel zêta…….……. 78
III.2.1.3. Résultat d'analyse comparée par la MEB-EDS …….. 78
III.2.2. Facteurs de variation du pouvoir adsorbant du nanochitosane……... 81
III.2.2.1. Effet du temps d'interaction……..… 81
III.2.2.2. Effet du pH de la solution d'ions metaliques…… 81
III.2.2.3. Effet de la charge initiale en nickel…….. 83
III.2.2.4. Effet de la température……..……. 85

III.2.3. Réutilisation de nanochitosane dans l'adsorption du nickel (II)…….. 85
III.2.4. Particularités des isothermes d'adsorption…….. 87
III.2.5. Cinétique d'adsorption du nickel par le nanochitosane……..…… 87
III.2.5.1. D'après le modèle pseudo premier et second ordre……. 87
III.2.5.2. D'après la diffusion intra particulaire……..…… 89
III.3.Pouvoir d'absorption des biofilms élaborés à partir des bactéries isolées du criquet Pèlerin vis-à-vis du cobalt et di nickel…….….. 90
III.3.1.Résultat d'identification des bactéries isolées de chez le criquet pèlerin…… 90
III.3.1.1.Isolement des souches à partir de criquet pèlerin…….……. 90
III.3.1.2. La coloration de Gram……. 90
III.3.1.3. Identité génétique des souches bactériennes…… 91
III.3.2. Pouvoir de productions des exopylsaccharides …….. 91
III.3.3. Efficacité des biofilms élaborés dans l'adsorption du cobalt et du nickel…… 93
III.3.4. Résultat d'analyse du pouvoir adsorbant des souches de *Sphingomonas echinoides*isolées de chez le criquet pèlerin…….. 95
III.3.4.1. Résultat de la FTIR avant et après adsorption ……...……. 96
III.3.4.2. Résultat de la MEB…….. 99
Conclusion……..……. 100
Références bibliographiques……..……. 103
Publication

Introduction

Introduction

L'eau est un partenaire quotidien de l'homme qui l'utilise pour satisfaire ses besoins quotidiens de consommation et d'hygiène. Elle sert de boisson, à la cuisson des aliments, la production alimentaire et la transformation des produits, l'hygiène corporelle, l'assainissement du cadre de vie, la production d'électricité et l'usage récréatif, en à l'irrigation en agriculture, ainsi qu'elle est indispensable dans différentes industries.

Du fait de la croissance démographique, de l'accroissement des besoins pour l'agriculture et l'industrie, du changement des habitudes de consommation, de l'expansion des réseaux d'approvisionnement en eau, des changements climatiques, la demande en eau, dans son ensemble, augmente (**Quist-Jensenet *al*., 2015; Falizi et *al*., 2018**). La planète terre renferme enore beaucoup d'eau. Sur les 70% de surface de la planète qu'occupe l'eau, il y a seulement une petite partie de cette eau qui est convenable pour la consommation humaine ou l'usage agricole (approximativement 0.5% de toute l'eau de la planète) **(Lindberg, 1997)**. Cette petite fraction d'eau douce doit pourtant satisfaire l'ensemble des besoins de l'humanité **(Jeppsson, 1996)**.

Depuis l'antiquité, la qualité de l'eau a été un facteur important pour assurer la santé humaine. Aujourd'hui, un des problèmes environnementaux les plus graves c'est la pollution de l'hydrosphère, qui est accentuée par les activités humaines. Partout dans le monde, la qualité de l'eau est en détérioration par des déchets industriels de nature chimique. Parmi les polluants qui représentent un risque potentiel pour la nature, on trouve les colorants et les métaux lourds, qui sont des micropolluants qui entrainent des nuisances même en faible quantité parce que leur toxicité se développe par une bioaccumulation. En effet les collectivités locales sont confrontées à des problèmes de traitement des eaux des rejets domestiques et industriels chargés par des polluants néfastes ayant un effet mutagène et cancérigène. Pour cela, la nécessité d'un traitement adéquat des eaux usées contribuerait à l'amélioration de la qualité de ces eaux polluées.

Devant cette situation, il existe des procèdes de traitement biologiques, physiques et chimiques ou mixtes ont été employés afin de réduire tant bien que mal la concentration encolorant et en métaux lourds. Mais le problème qui se pose c'est le coût élevé de ces traitements. C'est pourquoi, des investigations sur de nouveaux procédés plus efficaces et moins coûteux seraient intéressantes. C'est ainsi que les recherches se sont alors orientées

vers des procédés de traitement faisant appel à des matériaux naturels moins coûteux tels que la chitine et le chitosane qui sont lesbiopolyméres les plus attractifs économiquement dans le traitement des eaux usées en raison de leurs propriétés intrinsèques et de leur abondance. De plus, ils sont biodégradables et biorésorbables, deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement devient obligatoire.

La biosorption par les biofilms bactériens est un processus dans lequel certains microorganismes, vivants ou morts, peuvent se lier et concentrer les polluants à partir de solutions aqueuses **(Naja et Volesky, 2006)**. Les mécanismes de biosorption peuvent impliquer une absorption et un stockage intracellulaires via des systèmes actifs de transport cationique, une liaison de surface ou les mêmes mécanismes non identifiés. Les caractéristiques chimiques et biologiques de ces processus d'absorption sont importantes pour comprendre le rôle des ions métalliques dans les fonctions cellulaires de base et aussi pour la détoxification des effluents industriels pollués par les métaux par application de biomasse **(Acosta et *al.*, 2005)**. Les microorganismes ont un rapport surface-volume élevé en raison de leur petite taille et peuvent donc fournir une grande interface de contact, qui interagirait avec les charges des ions du milieu environnant **(Zouboulis et *al.*,2004).**

L'adsorption est l'une des techniques les plus adoptées pour cette élimination de polluants, à cause de sa grande capacité d'épurer les eaux contaminées. Le chitosane est l'adsorbant le plus couramment utilisé, et nécessite en plus une régénération, constituant un facteur limitant. Ceci a donc encouragé des travaux de recherche. En effet la performance et l'efficacité de cette technique d'adsorption dépend d'une façon prépondérante de la nature du support utilisé comme adsorbant, son coût, son abondance, sa régénération, etc…

Dans ce travail, il s'agit de tester des biomatériaux issus des carapaces des crustacées (chitosane et nanochitosan), et des biofilms bactériens formés a partir des bactéries isolées du Criquet Pèlerin de la wilaya de Tiaret, afin d'éliminer des polluants organiques et inorganiques, particulièrement des colorants et des métaux lourds.

Le présent manuscrit est structuré en trois chapitres dont le premier est consacré à une revue bibliographique traitant des généralités sur la pollution de l'eau et les procédés de traitement des eaux usées chargées en colorants et en métauxlourds, ainsi que des informations générales sur les adsorbants utilisés dans cette étude (chitosane, nanochitosane et les biofilms).

Le deuxième chapitre décrit le protocole expérimental exécuté et les différentes méthodes utilisées dans la préparation et l'analyse des adsorbants, ainsi que dans les essais d'adsorption des colorants et des métaux lourds par les biomatériaux.

Dans le troisième chapitre, nous présentons l'essentiel de nos résultats que nous confrontons à ceux publiés auparavant par d'autres chercheurs avant de conclure et d'évoquer les perspectives ouvertes par cette problématique en matière de dépollution étendue à d'autres substances et à d'autres sites.

Chapitre I

Généralités sur la pollution de l’eau et les procédés de traitement des eaux usées chargées en colorants et en métaux lourds

Chapitre I: Généralités sur la pollution de l'eau et les procédés de traitement des eaux usées chargées en colorants et en métaux lourds

I.1. La pollution de l'eau

Avec le développement industriel, les problèmes de pollution de l'eau ont pris un tour d'abord régional puis continental et désormais, maintenant, il est mondial. Une grande quantité d'eau est polluée par les usages industriels, agricoles ou encore domestiques. L'industrie utilise de grandes quantités d'eau mais le principal problème tient à ce que la majeure partie de cette eau retourne à la nature, polluée car chargée de déchets, de produits chimiques et de métaux lourds. Plus de 85% de l'eau consommée par l'industrie sont retournés à la nature sous forme d'eau usée **(Gupta, 1992)**. Des évaluations récentes ont permis de rapporter que les principaux polluants de l'eau sont les effluents d'égout, les nutriments, les métaux toxiques rejetés par les industries en activité et surtout les installations minières abandonnées ainsi que les produits chimiques utilisés dans l'industrie et en agriculture **(PNUE, 1991)**.

La lutte contre cette pollution est d'autant plus difficile car elle est diluée dans l'eau et souvent invisible et que certains toxiques infiltrés dans le sol ne produisent souvent leur effet qu'à long terme et que de nombreux polluants agissent en synergies complexes.

I.1.1. Définition

L'eau est la deuxième en importance après l'air pour la vie humaine sur terre. Notre eau est composée d'eau de surface telle que les rivières, les lacs, les mers et d'eau souterraine **(Jeng, 2007)**.

Le terme « pollution » désigne la présence d'une substance au-delà d'un seuil pour lequel des effets négatifs sont susceptible de se produire ou toute modification anthropogénique d'un écosystème se traduisant par un changement de concentration des constituants chimiques naturels, ou résultant de l'introduction de substances chimiques artificielles ; toute perturbation du flux de l'énergie, de l'intensité des rayonnements, de la circulation de la matière ; toute altération d'une biocénose naturelle provoquée par une modification due à l'homme de l'abondance de certaines de ses espèces ou à la pullulation d'espèces exotiques introduites dans des habitats éloignés de leur aire d'origine (**Ramade, 2007; Cemagref, 2011).**

La pollution de l'eau est une dégradation physique, chimique ou biologique de ses qualités naturelles, provoquée par l'homme et ses activités. Elle perturbe les conditions de vie et l'équilibre de milieu aquatique, compromet les utilisation de l'eau **(Brémaud et *al*, 2006; Berg et *al*., 2009)**.

I.1.2. Législation en matière de pollution

La législation sur les rejets d'eaux résiduaires devient de plus en plus stricte. La Tunisie est dotée d'une réglementation (**NT 106.02, 1989**) sur les rejets d'effluents dans le milieu hydrique. Le tableau 1 précise les limites réglementaires de ces- rejets.

Tableau 1: Normes tunisiennes (NT 106.02) des rejets d'effluents.

Paramètres	Domaine public Hydraulique	Canalisations Publiques	Domaine public Maritime
PH	6,5-8,5	6,5-9,0	6,5-8,5
MES (mg/l)	30	400	30
DCO (mg O_2/l)	90	1000	90
DBO_5 (mg O_2/l)	30	400	30
Chlorure (mg/l)	600	700	Sans exigence
Chlore actif (mg CL_2/l)	0,05	1	0,0,5
SO_4^{2-} (mg/l)	600	400	1000
Na^+ (mg/l)	300	1000	Sans exigence
NO_3^- (mg/l)	50	90	90
NO_2^- (mg/l)	0,5	10	5

I.1.3. Différents types de pollution

I.1.3.1. Selon l'origine des substances polluantes

Selon l'origine des substances polluantes, on peut distinguer quatre catégories de la pollution: pollution domestique et urbaine, pollution industrielle, pollution agricole et pollution naturelle**(Brémaud et *al*., 2006 ; Gili et *al*., 2008)**.

I.1.3.1.1. Pollution domestique et urbaine

Elle provient des habitations et elle est, en générale, véhiculée par le réseau d'assainissement jusqu'à la station d'épuration. La pollution domestique se caractérise par des germes fécaux, de fortes teneurs en matières organiques, des sels minéraux (azote, phosphore) et des détergents **(Faurie et *al.*, 2012)**. Les eaux usées domestiques et urbaines représentent 400l/jour/hab. Elles peuvent être responsables de l'altération des conditions de transparence et d'oxygénation de l'eau (les détergents causent un film et une mousse en surface de l'eau), ainsi que du développement de l'eutrophisation dans les rivières (**Brémaud et *al.*, 2006**).

I.1.3.1.2. Pollution industrielle

Elle provient des usines et caractérisée par la présence d'une grande diversité des polluants, selon l'utilisation de l'eau dans les procédés industriels (refroidissement, lavage, extraction, mise en solution…etc.) (**Gaujous, 1995**).

Selon l'activité industrielle, on trouve des graisses et matières organiques (industries agroalimentaires, abattoirs et équarrissage), des hydrocarbures (industries pétrolières, transports), des métaux (traitements de surface, métallurgie), des acides-bases et produits chimiques divers (industries chimiques et pharmaceutiques, tanneries), des métaux (traitements de surface, métallurgie), des matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs)**(Ramade , 2011; Faurie et *al.*, 2012).**

Ces polluants industriels peuvent causer des pollutions organiques, chimiques ou physiques (réchauffement des centrales thermiques, matières en suspension de la sidérurgie, radioactivité …) (**Brémaud et *al.*, 2006**). Il peut y avoir un effet toxique sur les organismes vivants, par l'accumulation de certains éléments dans les denrées alimentaires tels que les métaux et les pesticides **(Calvet et *al.*, 2005; Brémaud et *al.*, 2006)**.

I.1.3.1.3. Pollution agricole

Elle a pour origine les cultures et les fermes. Les principaux polluants sont : les sels minéraux en grandes quantités (d'azote, de potassium et de phosphate) et des produits chimiques (produits phytosanitaires et herbicides) (**Faurie et *al.*, 2012).**

Les herbicides, insecticides et autres phytosanitaires ont été de plus en plus utilisés et se sont accumulés dans les sols, les nappes phréatiques et la chaine alimentaire. En Bretagne

(France), certains cours d'eau ont enregistré des teneurs en nitrates supérieures à 50mg/L, lorsque la quantité d'engrais riche en azote et en phosphore épandue est supérieure aux besoins de la plante, ces minéraux vont entrainer la pollution des sols et des eaux **(Brémaud et *al.*, 2006**).

I.1.3.1.4. Pollution naturelle

Certains auteurs considèrent que divers phénomènes naturels sont aussi à l'origine de pollution: par exemple, une éruption volcanique, un épanchement sous-marin d'hydrocarbures, le contact avec des filons géologiques (métaux lourds), une source thermominérale, etc **(Faurie et *al.*, 2012 ; Brémaud et *al.*, 2012).**

Les tableaux 2 et 3 montrent des exemples de polluants importants des eaux usées et leurs sources, ainsi que les polluants susceptibles de se retrouver dans les rejets domestique, industriel et agricole.

I.1.3.2. Selon la nature des polluants

Selon la nature des polluants, on distingue divers types de pollution : pollution physique, chimique et biologique **(Ramade , 2011; Brémaud et al., 2012)**.

I.1.3.2.1.Pollutionphysique:

On parle de ce type de pollution quand le mileu pollué est modifié dans sa structure physiquepar divers facteurs. On peut la repartir en trois classes: mécanique, thermique et radioactive **(Stellman, 2000; Goudet et Kowalski , 2011; Ramade, 2011)**.

I.1.3.2.2.Pollution chimique

Les polluants de nature chimique, dissous ou en suspension dans l'eau, sont des substances toxiques pour la flore, la faune et l'homme, et présents à des concentrations telles dans les milieux naturels qu'ils ont des répercussions sur l'environnement et la santé. Les polluants connus du public et que l'on retrouve dans les effluents sont nombreux, allant des nitrates, phosphates, détergents, produits phytosanitaires (pesticides), solvants chlorés, en passant par les métaux lourds (plomb, nickel, mercure, chrome), les colorants, les produits

minéraux. Ces exemples montrent la diversité de la nature chimique des polluants qui peut être organique, minérale ou métalique **(Crini et Bado , 2007 ; Goudet et Kowalski , 2011)**.

I.1.3.2.3.Pollution biologique

La pollution biologique englobe toutes les pollutions provoquées par des matières organiques susceptibles de subir une fermentation bactérienne.

La pollution biologique des eaux se traduit par une forte contamination bactérienne, contient des matieres fécales. Les principaux organismes pathogènes qui se multiplient ou qui sont transportés dans l'eau sont: les bactéries, les virus, les parasites, les champignons et les algues. Ils sont dangereux pour la santé humaine, et limitent donc les usages que l'on peut faire de l'eau **(Baumontet *al*., 2004)**.

La pollution microbiologique est la présence en quantité excessive de germes, bactéries et virus, parmi lesquels certains sont pathogènes. La pollution de l'eau de boisson reste la première cause de mortalité dans le monde : épidémies bactériennes (choléra, salmonellose, infection due à *Escherichiacoli*..), virales (hépatites, gastro-entérites) ou à protozoaires (*Entamoebahistolytica*, cause de dysenterie). Ces germes disparaissent naturellement en quelques jours, mais leur puissance contaminante est élevée: $1m^3$ d'eau usée suffit à polluer 50000 m^3 d'eau de mer **(Brémaud et *al*., 2006**).

I.1.4. Les facteurs de pollution

Les principaux paramètres pris en compte pour évaluer le niveau de pollution des eaux usées urbaines sont les nitrates, phosphates, l'acidité, la demande chimique et biochimique en oxygène, la température…etc., ainsi que les pesticides et les autres micropolluants **(Méot et Alamy, 1999)**. Parmi ces paramètres, on peut distinguer :

- Les matières en suspension MES): exprimées en mg par litre. Ce sont les matières non dissoutes de diamètre supérieur à 1µm contenues dans l'eau. Elles comportent à la fois des éléments minéraux et organiques et décantent spontanément.

-Les paramètres physiques**:** ils comportent l'oxygène dissous, indispensable à la respiration de la faune et de la flore aquatique, la température et la turbidité.

Tableau 2 Polluants des eaux usées et leurs sources (**Crini et Badot,2007)**.

Polluants	Source
Solides (en suspension)	Domestique, industrie, infiltration
Matières organiques biodégradables	Domestique, industries
Matieres organiques réfractaires	Industries
Métaux lourds	Industries, mines
Engrais, pesticides	Agricole
Nutriments	Domestique, industries, agricole
Solides dissous inorganiques	Domestique, industries
Organismes pathogènes	Domestique

Tableau 3: Exemples de polluants retrouvés dans les trois grandes sources de pollution (chaque pourcentage indique la proportion de points de contrôle en France présentant une concentration moyenne élevée de la substance polluante concernée) **(Ifen, 2007)**.

Rejet	Exemple de polluants
Domestique	Phosphore (30%) Matière organique (40%) Hydrocarbures aromatiques polycycliques (93%)
Industriel	Métaux (plomb,codmium,nickel,mercure)(70%) Pyralène (PCB) (transformateurs) (31%) Hydrocarbures aromatiques polycycliques (93%) Micropolluants organiques (4%)
Agricole	Nitrate (engrais) (50%) Phosphore (30%) Pesticides (36%)

-La Demande biochimique en oxygène en 5 jours (DBO_5) représente la concentration en matières organiques biodégradables présentes dans l'eau; alors que la demande chimique en oxygène (DCO) désigne la concentration en matières oxydables. Ces deux paramètres permettent de déterminer la quantité d'oxygène nécessaire pour l'élimination de la pollution organique **(Ifen, 2004)**.

-Les paramètres biologiques**:**Les espèces animales et végétales sont des indicateurs de la qualité des milieux aquatiques. quatre groupes d'espèces – les diatomées (algue microscopique), les macrophytes (végétaux aquatiques identifiables à l'œil nu), les macro-invertébrés (insectes larves et adultes, crustacés, mollusques et vers) et les poissons - sont suivis comme bio-indicateurs de l'état des cours d'eau.

-Les paramètres chimiques:Ils englobent les micropolluants qui sont des substances pouvant être toxiques à faible dose pour l'homme et l'écosystème, et les macropolluants.

-Les teneurs en azote et en phosphore : sont également des paramètres très importants, à cause des problèmes d'eutrophisation expliqués plus haut **(Ifen, 2004; Brémaud et *al*., 2006)**.

I.1.5. Différents types de polluants

D'après l'**Ifremer (2008)**, un polluant est une substance ou processus de nature physique, chimique ou biologique introduit par l'homme et susceptible de contaminer les divers écosystèmes, terrestres, limniques ou marins. Le polluant est une substance qui se trouve dans les différents biotopes à une concentration supérieure, ou dans certains cas, différente de sa concentration habituelle. On distingue les polluants primaires (rejetés directement dans le milieu naturel) et les polluants secondaires (qui proviennent de réactions sur les premiers, ou entre eux).

Un macropolluant, **selon *SOeS*(Service de l'observation et des statistiques, ex institut francais de l'environnement, 2008)**, est un ensemble comprenant les matières en suspension, les matières organiques et les nutriments, comme l'azote et le phosphore. Les macropolluants peuvent être présents naturellement dans l'eau, mais les activités humaines en accroissent les concentrations (rejets d'eaux usées, industrielles ou domestiques, ou pratiques agricoles). Par opposition aux micropolluants, toxiques à très faibles doses, l'impact des macropolluants est visible à des concentrations plus élevées.

D'après **Ministère française chargé de l'environnement** et **Agence française de la Biodiversité, 2016)**, un micropolluant présent généralement en faible concentration dans un milieu donné (de l'ordre du µg au mg /L ou Kg) et qui peut avoir un impact notable sur les usages et les écosystèmes.

I.1.5.1. Les colorants

Depuis l'antiquité, les colorants ont été utilisés dans, pratiquement, toutes les sphères de notre vie quotidienne: pour la peinture et la teinture du papier, de la peau et des vêtements, etc. Jusqu'à la moitié du 19ème siècle, les colorants utilisés étaient d'origine naturelle. Des pigments inorganiques tels que l'oxyde de manganèse, l'hématite et l'ancre étaient utilisés. Par ailleurs, des colorants naturels organiques ont été utilisés, surtout dans l'industrie textile.

Ces colorants sont tous des composés aromatiques qui proviennent essentiellement des plantes, tel que l'alizarine et l'indigo **(Zhenwang et *al*., 2000)**. On dénombre environ 8000 colorants synthétiques chimiquement différents, répertoriés dans le Colour Index **(Guivarch , 2004)** sous 40000 dénominations commerciales. Chaque colorant y est classé sous un nom de code indiquant sa classe, sa nuance ainsi qu'un numéro d'ordre (exemple: CI Acid Orange 7).

Un colorant doit posséder, outre sa couleur propre, la propriété de teindre résultante d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre et qui est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements. En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur lesquels ils ont appliqués : résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment les détergents) et aux attaques microbiennes.

L'affinité du colorant pour la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique accentué. Ces caractéristiques propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu disposés à la biodégradation **(Ganesh, 1992)**.

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à adsorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 380 à 750nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés chromophores: la molécule colorante étant le chromogène ; plus la facilité du groupe chromophore à donner un électron est grande plus la couleur sera intense.

D'autres groupes d'atomes du chromogène peuvent intensifier ou changer la couleur dûe au chromophore: ce sont les groupes auxochromes **(Brown et Deviti, 1993)**. Les chromophores sont des systèmes à liaisons π conjuguées ou des complexes de métaux de transition. La coloration correspond aux transitions possibles après absorption du rayonnement lumineux entre ces niveaux d'énergie propres à chaque molécule **(Capon et *al*., 1999)**.

I.1.5.1.1. Les différentes classes de colorants

Tous les composés aromatiques absorbent l'énergie électromagnétique mais seulement ceux qui ont la capacité d'absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 380 à 750nm) sont colorés. En outre, les colorants consistent en un assemblage de groupes chromophores (groupes aromatiques conjugués, (liaisonπ), comportant des liaisons non liantes (électron e ou des complexes de métaux de transition), auxochromes et de structures aromatiques conjuguées (cycles benzéniques, anthracène, perylène, etc...).

Lorsque le nombre de noyau aromatique augmente, la conjugaison des doubles liaisons s'accroît et le système conjugué s'élargit. L'énergie des liaisons πdiminue tandis que l'activité des électrons πou n augmente et produit un déplacement vers les grandes longueurs d'onde. De même, lorsqu'un groupe auxochrome donneur d'électrons (amino, hydroxy, alkoxy,…) est placé sur un système aromatique conjugué, ce groupe se joint à la conjugaison du système p, la molécule absorbe dans les grandes longueurs d'onde et donne des couleurs plus foncées **(Zollinger , 1991)**(fig.1).

Les colorants présentent une diverse structure considérable et ils sont classifiés de plusieurs manières, par leur structure chimique (colorants azoïques, anthraquinoniques, indigoïdes, etc.) ou selon leur application au type de fibre. Les colorants peuvent être

également classifiés suivant leur solubilité **(Rangabhashiyam et *al.*, 2013).**Les chromophores et auxochromes habituels sont résumés dans le tableau 4.

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupe chromophore **(Servais, 1999)** (tableau4).

Tableau 4: Principaux groupes chromophores et auxochromes des colorants classés par intensité croissante **(Servais, 1999)**.

Groupes chromophores	Groupes auxochromes
Azo (-N=N-)	Amino ($-NH_2$)
Nitroso (-NO ou –N-OH)	Méthylamino ($-NH(CH_3)_2$)
Carbonyl (=C=O)	Diméthylamino ($-N(CH_3)_2$)
Vinyl (-C=C-)	Hydroxyl (-HO)
Nitro ($-NO_2$ ou =NO-OH)	Alkoxyl (-OR)
Sulfure (>C=S)	Groupe donneurs d'électrons

I.1.5.1.1.1. Les colorants azoïques

Les colorants "azoïques" sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Ces structures qui reposent généralement sur le squelette de l'azobenzène, sont des systèmes aromatiques ou pseudo aromatiques liés par un groupe chromophore azo (fig.1A).

I.1.5.1.1.2. Les colorants anthraquinoniques

D'un point de vue commercial, ces colorants sont les plus importants après les colorants azoïques. Leur formule générale dérivée de l'anthracène montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amines (fig.1B).

I.1.5.1.1.3. Les colorants indigoïdes

Ils tirent leur appellation de l'indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues sélénié, soufréet oxygéné du bleu indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquois (fig.1C).

I.1.5.1.1.4. Les colorants xanthène

Ces colorants sont dotés d'une intense fluorescence. Le composé le plus connu est la fluorescéine. Peu utilisé en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accidents maritimes ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie (fig.1D).

I.1.5.1.1.5. Les phtalocyanines

Ils ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre. Les colorants de cegroupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.) (fig.1E).

I.1.5.1.1.6. Les colorants nitrés et nitrosés

Ces colorants forment une classe très limitée en nombre et relativement ancienne. Ils sont actuellement encore utilisés, du fait de leur prix très modéré lié à la simplicité de leur structure moléculaire caractérisée par la présence d'un groupe nitro (-NO2) en position ortho d'un groupement électrodonneur (hydroxyle ou groupes aminés) (fig.1F).

I.1.5.1.1.7. Les colorants triphénylméthanes

Les triphénylméthanes sont des dérivés du méthane pour lesquels les atomes d'hydrogène sont remplacés par des groupes phényles substitués dont au moins un est porteur d'un atome d'oxygène ou d'azote en para vis-à-vis du carbone méthanique. Le triphénylméthane et ses homologues constituent les hydrocarbures fondamentaux d'où dérivent toute une série de matières colorantes (fig.1G).

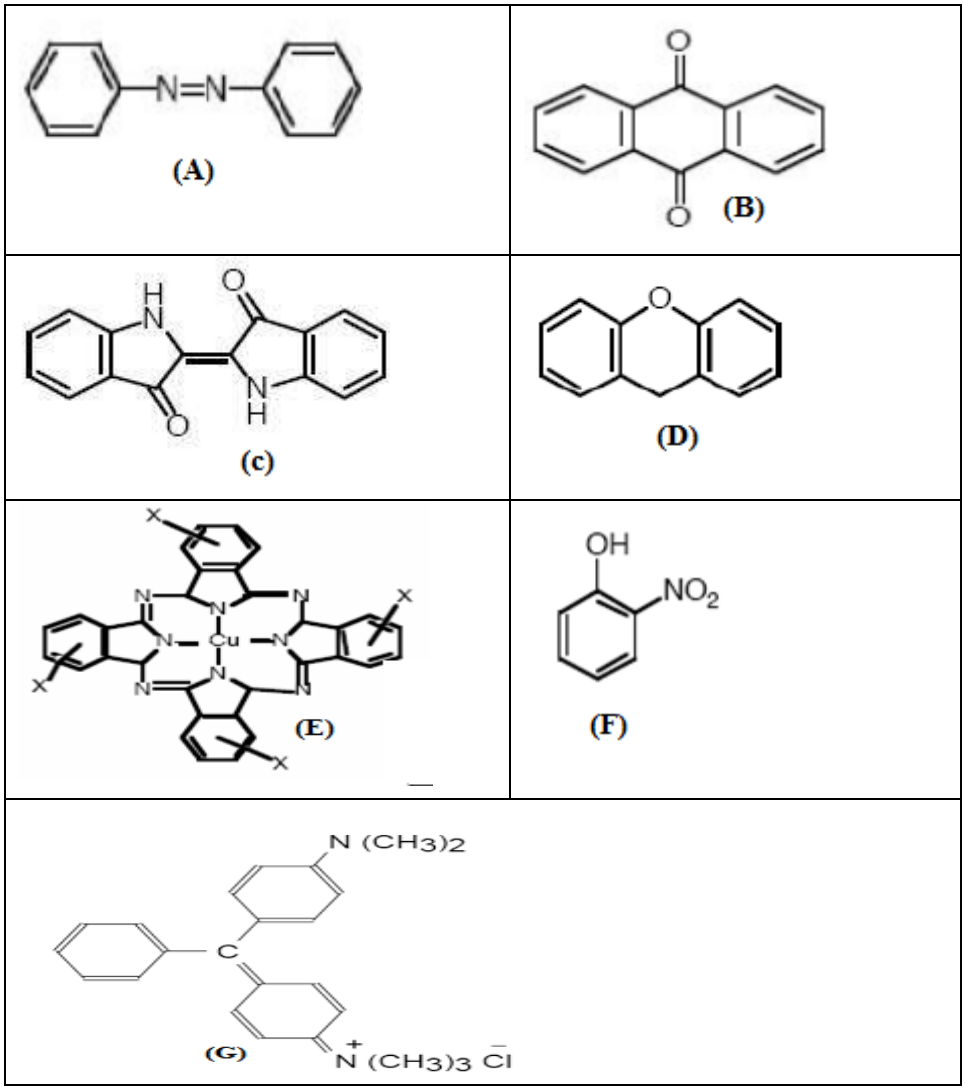


Figure 1: les différentes classes de colorants : (A) colorants azoiques ,(B) colorants anthraquinoniques ,(C)colorants indigoïdes ,(D)colorants xanthène ,(E)phtalocyanines ,(F)colorants nitrés et nitrosés ,(G)colorants triphénylméthan **(Servais, 1999).**

I.1.5.1.2. Les colorants et leurs impacts environnementaux

Beaucoup de colorants sont visibles dans l'eau même à de très faibles concentrations (<1mg. L^{-1}). Ainsi, ils contribuent aux problèmes de pollution liés à la génération d'une quantité considérable d'eau usée contenant des colorants résiduels **(Greene et Baughman, 1996)**. Le rejet de ces eaux résiduaires dans l'écosystème est une source dramatique de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par

conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire.

Si un organisme ne dispose pas de mécanismes spécifiques, soit pour empêcher la résorption d'une substance, soit pour l'éliminer une fois qu'elle est absorbée, alors cette substance s'accumule. Les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, se retrouvent exposées à des teneurs en substances toxiques pouvant être jusqu'à cent mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau.la figure 2 représente un exemple d'une bioaccumulation après déversement des insecticides dans un cours d'eau .

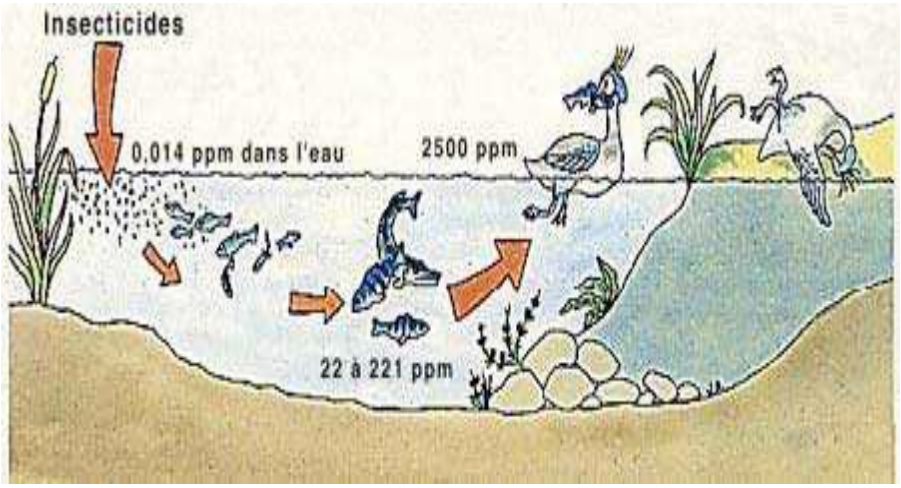


Figure 2: Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau **(Little et Chillingworth, 1974)**.

I.1.5.1.3. Toxicité des colorants

La toxicité des différents types de colorants (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) a été étudiée par plusieurs travaux de recherche aussi bien sur des organismes aquatiques (poisson, algue, bactéries, etc.) que sur les mammifères. En outre, des recherches ont été effectuées pour étudier l'effet des colorants sur l'activité des bactéries aérobies et anaérobies dans des systèmes de traitement des eaux résiduaires.

Des études faites sur divers colorants commerciaux ont démontré que les colorants basiques sont les plus toxiques pour les algues **(Clarke et Anliker, 1980; Specht et Platzek, 1995)**. Ce résultat a été prouvé par le test de mortalité des poissons effectués sur 3000 colorants commerciaux où il s'est avéré que les colorants basiques, et plus particulièrement ceux de la famille de triphénylméthane sont les plus toxiques. Par ailleurs, les poissons semblent être relativement sensibles aux colorants acides **(Brown et Deviti, 1993).**

D'autre part, la mortalité examinée avec des rats a montré que seulement 1% sur 4461 colorants commerciaux présentent des valeurs de DL50 au dessous du poids corporel de 250 $mg.kg^{-1}$. Par conséquent, la chance de la mortalité humaine due à la toxicité aiguë de colorant est probablement très basse. Cependant, il faut sensibiliser l'être humain quand à l'utilisation de certains colorants. En effet, il a été prouvé que quelques colorants dispersés peuvent causer des réactions allergiques, dermatologiques, etc… **(Chung et *al.*, 1981)**.Par ailleurs, l'effet d'exposition des ouvriers dans l'industrie de textile aux colorants a suscité l'attention.

Par conséquent, il s'est avéré que l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques. La plupart des colorants azoïques ne sont pas initialement toxiques, excepté ceux à groupement amine libre **(Rosenkranz et Klopman, 1990)**. Cependant, la réduction de ces colorants (rupture de la liaison azoïque) génère la formation des amines aromatiques qui sont connues mutagéniques et cancérigènes. A titre d'exemple. On peut citer : 1,4 phenylenediamine, 1-amino 2-naphtol, benzidine et benzidine substitués comme otoluidine **(Cartwright,1983; Chung et Cerniglia,1992)**.

En revanche, la toxicité des amines aromatiques est fortement liée à la structure spatiale de la molécule ou, en d'autres termes, à la position des groupes aminés. Par exemple, le 2-naphtylamine est cancérigène, par contre le 1-naphtylamine est beaucoup moins toxique que le premier **(Jung et *al.*, 1992)**. La toxicité des colorants azoïques dépend ainsi de la nature et de la position des substituases. Elle est accrue par la présence de substituant sur le noyau aromatique notamment des groupes nitro ($-NO_2$) et halogènes (particulièrement Cl). Cependant, la substitution avec des groupes carboxyliques ou sulfonâtes diminue la toxicité **(Adosinda et *al.*, 2003)**.

Des travaux de recherche faisant objet l'étude de l'effet mutagénique et cancérigène des amines aromatiques sulfonées, ont montré qu'ils ne présentent aucun ou un très faible effet

génotoxique et cancérigène, contrairement à leurs analogues non sulfonés **(López et *al*., 2004)**.

En raison des effets mentionnés ci-dessus, il est clair que les colorants, essentiellement les azoïques, ne devraient pas envahir notre environnement. Par conséquent, il est nécessaire de traiter les eaux résiduaires chargées de colorants jusqu'à leur minéralisation totale.

I.1.5.2. Les métaux lourds

I.1.5.2.1. Définition

L'appellation «métal lourd» est souvent décriée. Ainsi, pour **Hodson (2004)**, c'est un terme imprécis utilisé pour désigner des éléments métalliques ayant un effet néfaste sur l'environnement. Ce terme est souvent mal défini, en effet on peut trouver une multitude de définitions souvent contradictoires basées sur la densité, le poids atomique, le numéro atomique ou d'autres propriétés des éléments ou leurs composés caractérisé par une masse volumique supérieure à 5 g/cm^3. Actuellement, dans la nature, 41métaux et 5 métalloides sont identifiés (**Weber et Wjolfe, 1987; Hodson, 2004)**.

Le terme métaux lourds, implique aussi une notion de toxicité. Le terme «éléments traces métalliques» est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (**Baker et Walker , 1989**). Dans ce contexte, le terme « métaux lourds » sera utilisé dans le sens de l'impact toxique sur les humains et les environnements (**Huynh , 2009**).

Les métaux lourds sont des micropolluants de nature à causer des problèmes même présents sous forme de traces de l'ordre du µg/L **(Phattaranawik et *al*., 2003)**. D'un point de vue biologique ; on distingue deux types de métaux lourds en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques **(Anne et Isabelle, 2005)**.

I.1.5.2.2. Les sources de métaux lourds

I.1.5.2.2.1. Source naturelle

Les réserves les plus importantes en métaux lourds se trouvent dans les roches et/ou les sédiments océaniques, ils sont introduits dans la biosphère via, les volcans, l'activité des sources thermales, l'érosion et l'infiltration (**Miquel, 2001).**

I.1.5.2.2.2. Sources liées à l'activité humaine

Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives et entraînent de ce fait des risques très supérieurs aux métaux d'origine naturelle qui sont le plus souvent immobilisés sous des formes relativement inertes.

Une quantité importante de métaux lourds est introduite dans l'environnement par l'homme, cette contamination a plusieurs origines, telles que les gaz d'échappements des véhicules, la combustion des fossiles, l'incinération, l'activité minière, l'agriculture, les déchets liquides et solides (eaux usées, boues d'épuration, ordures ménagères) (**Miquel, 2001**).

I.1.5.2.3. La toxicité des métaux lourds

La toxicité des métaux lourds n'est plus à démontrer. Par exemple celle du mercure est connue depuis l'antiquité. Dans la majorité des cas les effets toxiques de ces métaux lourds se manifestent au niveau du système nerveux, le sang ou la moelle osseuse.Ils sont généralement cancérigènes. Donc la nécessité d'éliminer ou de récupérer ces métaux lourds polluants pour l'environnement n'est plus à discuter **(Tamburini et *al.*, 2013; Monnet-Tschudi et *al.*, 2006)**.

I.2. Les procédés de traitements des eaux usées chargées en colorants et en métaux lourds

Chaque procédénécessite des opérations unitaires bien déterminé. Les types et les procédés utilisés dans le traitement des eaux usées sont de nature physiques, chimiques et biologiques ;les traitements et les opérations unitaires sont résumés dans le tableau 5.

I.2.1.Procédés chimiques

I.2.1.1. Précipitation des hydroxydes métalliques

Cette méthode de traitement est généralement appliquée aux effluents fortement chargés en polluants métalliques ; ceux-ci sont généralement précipités sous forme d'hydroxydes, par élévation du pH mais, selon les procédés utilisés, la précipitation a lieu sous forme d'hydroxydes de calcium $Ca(OH)_2$, de carbonates ($NaHCO_3$) ou plus rarement, sous forme de sulfures.

Tableau 5: Les procédés de traitement utilisés et opérations unitaires associées (**Simate et *al*.,2011**)

Traitements	Operations unitaires
Physique	Screening Broyage Egalisation du flux Sédimentation Coagulation / floculation Filtration
Chimique	Précipitation chimique Adsorption Désinfection Chloration
Biologique	Boues Activées Lagunes aérées Filtres percolateurs Rotation contacteurs biologiques Digestion anaérobie

Parailleurs, la précipitation ne suffit pas toujours à elle seule pour réduire la concentration des ces polluants jusqu'aux seuils de rejets admissibles par les normes de qualité de l'eau **(Abdelhalim et *al*., 2003)**. De plus, le rendement de la précipitation est étroitement lié à la composition de l'effluent. En effet, l'efficacité de la précipitation, selon **Chen et Lin ,2001)**, diminue fortement en présence de certains composés, tel que l'EDTA, les phosphates ou les cyanures.

I.2.1.2. Les procédés d'oxydation classique

Ces méthodes de traitement sont couramment utilisées pour l'épuration d'effluents contenant des polluants organiques, y compris des colorants, en raison de leur mise en œuvre relativement facile. Ces procédés utilisent des oxydants puissants et variés tels que l'hypochlorite de sodium (NaOCl), l'ozone (O3), ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en présence ou non de catalyseur.

les procédés d'oxydation classique ont pour but de modifier la forme chimique des polluants métalliques soit pour les rendre insolubles et les éliminer par précipitation, soit pour les transformer en nouveaux produits solubles et moins toxiques. Enfin, les procédés

d'oxydation par l'ozone ou par le peroxyde d'hydrogène sont utilisés en complément ou en concurrence avec l'adsorption sur charbon actif ou la nanofiltration **(Crini et Badot, 2007)**.

I.2.1.3. Les procédés d'oxydation avancée(POA)

Les POA regroupent des méthodes chimiques, photochimiques ou électrochimiques **(Özcan et *al.*, 2008)**. Leur développement est en plein essor depuis environ trois décennies. Elles consistent à dégrader les molécules de colorants en CO_2 et H_2O par les rayons ultra-violets en présence de peroxyde d'hydrogène. Ces POA regroupent les technologies qui cherchent à dégrader les polluants organiques par oxydation via des procédés photocatalytiques susceptibles de développer des radicaux hydroxyles ($OH^{\cdot}$) dont le pouvoir oxydant est nettement supérieur à celui des oxydants traditionnels.

En plus des systèmes UV-peroxyde, UV-Ozone et du processus Photo-Fenton, qui ont largement démontré leur efficacité dans l'oxydation des composés organiques, la photocatalyse hétérogène a aussi émergé depuis quelques années **(Simon et *al.*, 2008)**.

I.2.2. Procédés physicochimiques

I.2.2.1. La coagulation-floculation

C'est un procédé de traitement primaire qui permet d'éliminer des impuretés contenues dans l'eau grâce à la réaction d'émulsion. La coagulation a donc pour but principal de déstabiliser les fines particules en suspension pour ainsi faciliter leur agglomération. Ce procédé, généralement caractérisé par l'injection et la dispersion rapide de produits chimiques, permet d'augmenter substantiellement l'efficacité des traitements secondaires. Il implique le plus souvent la dispersion instantanée d'un sel métallique trivalent Al(III) ou Fe(III) qui neutralise et déstabilise les particules colloïdales pour mener à la formation de flocs.

En neutralisant totalement ou partiellement les charges négatives sur ces particules, les interactions de van der Waals se retrouvent prédominantes, ce qui permet une agrégation des matières fines en suspension, puis leur floculation. De manière générale et en premier lieu, un agent coagulant est ajouté et l'eau usée est soumise à certaines conditions de brassage. Ensuite un floculant est ajouté pour permettre aux agrégats déjà formés par le coagulant, de s'élargir. L'intensité du brassage est habituellement faible lors du processus de floculation

afin que les particules entrent en contact plus facilement. En augmentant la taille des particules, le procédé de floculation accroît le taux de captage des flocs lors du traitement de filtration **(Lafleur et *al.*, 2008)**.

I.2.2.2. Les techniques membranaires

La perm-sélectivité des membranes a été découverte dès le XVIIIe siècle (Abbé Jean-Antoine Nollet, 1735). Cependant le développement industriel des techniques à membranes ne date que des années 1960 pour les dialyses et 1970 pour les techniques de solvo-transferts(osmose inverse ,microfiltration). La dialyse est un passage de substances dissoutes à travers une membrane calibrée perméable d'un milieu hypertonique vers un milieu hypotonique. L'opération de solvo-transfert consiste, en revanche, à faire traverser des membranes semi-perméables par un liquide, par convection forcée, afin d'épurer le solvant.

Ce sont les techniques de dialyse qui ont permis d'effectuer les premières séparations de composés dissous. Il était alors plus judicieux de laisser passer à travers la membrane une faible quantité de solutés plutôt que la grosse masse du solvant. Cette approche a donné lieu au développement de :

1.2.2.2.1. L'hémodialyse : qui désigne l'élimination des substances toxiques du sang à l'aide d'une membrane.

1.2.2.2.2. L'electrodialyse : est une dialyse où le mouvement des ions ou molécules chargées est accéléré par un champ électrique.

Ces systèmes en fonctionnement sont hors d'état d'équilibre et vont tendre spontanément vers un nouvel état d'équilibre. Cette évolution implique obligatoirement un transfert de matière et d'énergie au niveau de la surface de contact entre les deux phases, c'est à dire au niveau de l'interface, sous l'effet des contraintes imposées au système **(Berland et Juery, 2002).**

I.2.2.3. L'échange d'ions

Le procédé d'échange d'ions s'applique aux effluents contenant des colorants ou des ions métalliques **(Robinson et *al.*, 2001; Chuah et *al.*, 2005)**. Il a été montré que la performance des résines commerciales est parfois équivalente, voire inférieure à celle de

certains adsorbants lignocellulosiques chimiquement modifiés, comme par exemple les écorces de riz modifiées par l'acide chlorhydrique **(Kumar et Bandyopadhyay, 2006)** ou par l'acide tartrique **(Wong et *al*., 2003)**.

L'échange d'ions est utilisé généralement pour éliminer les composés indésirables d'une solution sans en changer la concentration ionique totale ou le pH. En cas d'épuration d'effluent chargés en métaux nobles ou précieux, il peut être intéressant d'un point de vue financier de régénérer l'échangeur d'ions, tandis que la récupération des métaux lourds est liée directement à la protection de l'environnement. Pa ailleurs, le traitement des effluents par échange d'ions et adsorption présente des caractéristiques communes **(Gupta et Suhas, 2009)**. Ainsi, ces techniques sont parfois regroupées et désignées sous le vocable de «procédé de sorption».

I.2.2.4. L'adsorption

Ā l'inverse de la précipitation, l'adsorption est plutôt efficace dans le domaine de faibles concentrations. Ses principaux inconvénients résident dans la compétition pour l'adsorption entre molécules de taille différente et le prix relativement élevé des matériaux. Les biosorbants sont pressentis pour jouer le rôle de substitut ou de complément aux charbons actifs commerciaux.

L'adsorption est un procédé de transfert de matière entre une phase liquide (ou gazeuse) chargée en composés organiques ou inorganiques et une phase solide qui est l'adsorbant. Pendant des décennies, les charbons actifs commerciaux ont été les principaux, voire les seuls adsorbants utilisés dans les filières de traitement des eaux. En effet, l'adsorption sur charbon actif présente de nombreux avantages dont l'élimination d'une large gamme de polluants incluant différents types de colorants.

I.2.3. Bioprocédés

La présence dans les eaux ou dans le sol, de polluants organiques a toujours existé. Leur élimination par des microorganismes constitue le moyen biologique que la nature a utilisé pour l'épuration des milieux naturels. Ces procédés biologiques se produisent selon deux modes: traitements en aérobie (ils sont effectués en présence de l'oxygène) et traitement en anaérobie (dans ce cas les microorganismes dégradent la matière organique en absence de l'oxygène).

I.2.3.1. Traitement aérobie

Ce procédé est resté longtemps un moyen pour dégrader un grand nombre de polluants organiques. Il s'est avéré efficace pour une certaine catégorie de rejets textiles **(Sani et Banerjee,1999)**. Notons cependant que des colorants tels que les azoïques, les colorants acides et les colorants réactifs se sont révélés persistants et résistent à ce mode de traitement **(Hitz et *al.*, 1978; Pagga et Taeger,1994)**. La décoloration observée dans ces cas n'est attribuée qu'à l'adsorption de ces polluants sur la boue activée et non à leur dégradation.

I.2.3.2. Traitement anaérobie

Ce procédé utilisé sur les boues résiduaires des stations d'épuration des eaux permet de produire des quantités importantes en méthane. Ce dernier est utilisé comme source d'énergie notamment pour le chauffage ou pour l'éclairage. Des études ont montré que la réduction, voire la disparition, de la couleur n'est pas accompagnée de la minéralisation des colorants. La formation de composés intermédiaires plus toxiques, notamment des amines a été signalée dans la littérature **(Weber et Wolfe, 1987;Carliell et *al*., 1995)**.

Venceslau et *al*. (1994) ont estimé la réduction de coloration par les procédés biologiques à seulement 10-20 %. Cette constatation laisse à présager d'autres techniques qui permettraient d'abaisser le degré de réfractabilité de la charge polluante en association avec les méthodes biologiques.

I.2.3.3. Matériaux utilisés dans les bioprocédés

I.2.3.3.1. Le chitosane et la chitine

I.2.3.3.1.1.Origine du chitosane

En 1811, le Pr. Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée "fongine". De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée chez certains insectes (coléoptères) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie «enveloppe»). En 1859, le Pr. C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et aobservé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin,

a pu être dissoute dans les acides. Cependant, c'est seulement en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler. La production du chitosane a débuté en 1920, mais sa structure chimique n'a été identifiée que 50 ans plus tard grâce à la cristallographie et la spectroscopie infrarouge **(Muzzarelli *et* Muzarrelli, 1986)**.

Le chitosane est une substance très peu répandue dans la nature (**Desbrières, 2002**). Il est rare et n'est présent que dans les parois cellulaires d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes (*Rhizopus, Mucor*), de bactéries et de levures, ainsi que chez certains insectes. Il n'y a donc pas de source primaire de chitosane exploitable. La source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés. La production de chitine (et du chitosane) provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes.

Néanmoins, de nouvelles voies alternatives sont apparues comme, par exemple, la production du chitosane à partir du champignon *Mucor rouxii* (**Tayel et al., 2010**), en raison notamment des inquiétudes sanitaires liées aux maladies animales.

I.2.3.3.1.2. Structure moléculaire comparée de la chitine, du chitosane et de la cellulose

Le chitosaneest un polysaccharide linéaire naturel, biodégradable, hautement cationique contenant des groupements amines primaire, qui réagissent avec la cellulose et l'amidon. La structure chimique du chitosane ressemble à celle de la cellulose par le fait qu'elle est constitué d'une chaine linéaire similaire à l'exception des groupements amines primaires (fig.3).

Le chitosane se distingue de la cellulose par sa structure moléculaire chargée positivement (polyamine) et pouvant êtremodifiée facilement. Le chitosane cationique présente un intérêt grandissant dans le domaine des polymères puisqu'il estdoté d'une forte densité de charge positive à l'inverse de la plupart des autres polymères naturels chargés négativement **(Sandford , 1989)**.

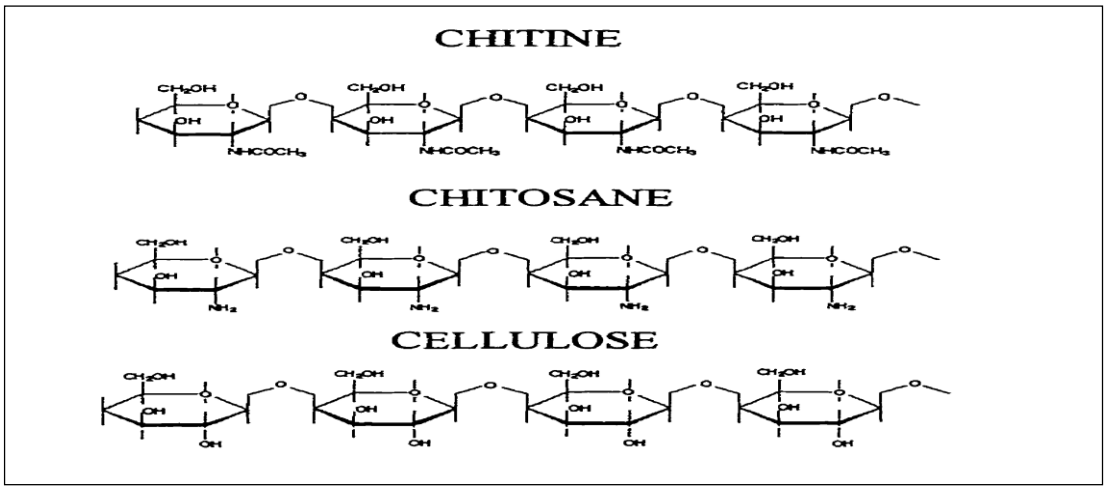


Figure 3: Comparaison des structures de la chitine, du chitosane et de cellulose **(Olteanu et Enescu, 2007**).

I.2.3.3.1.3. Elaboration du chitosane

L'intérêt de la production de ce polyglucosamine provient de l'importante quantité de ressources naturelles rejetées par l'industrie de la pêche.La désacétylation de la chitine (fig.4) est l'étape la plus délicate dans la production du chitosane. Elle nécessite la substitution des groupements acétyls pour aboutir au chitosane ; ce qui peut entrainer une réduction excessive de la longueur de chaine de ce polymère.

En c'est en jouant sur la durée du traitement alcalin et sur l'élévation de température, qu' il est donc possible d'obtenir différents chitosanes à partir d'une même chitine. Un degré de désacétylation inférieur à 10% est rarement atteint par un procédé simple, car la désacétylation totale nécessite plusieurs étapes. L'échantillon étant soit lavé soit dissout et reprécipité entre deux cycles. Ceci permet d'expliquer parfois la difficulté d'obtenir de manière reproductible des produits de composition prédéterminée**(Matis et Zouboulis , 1994;Comte et *al.*, 2008)**.

La qualité duchitosane peut varier selon l'origine de la matière première utilisée et de la procédure expérimentale d'extraction. La qualité des échantillons commerciaux de chitosane

sont jugés d'après leur couleur. La déprotéinisation, la déminéralisation ainsi que la désacétylation lors de l'extraction de la chitine influencent la qualité du produit fini, le chitosane. Il semble que la qualité du produit dépend aussi du type et de l'âge du crustacée ou du mollusque **(Comte et *al.*, 2008).**

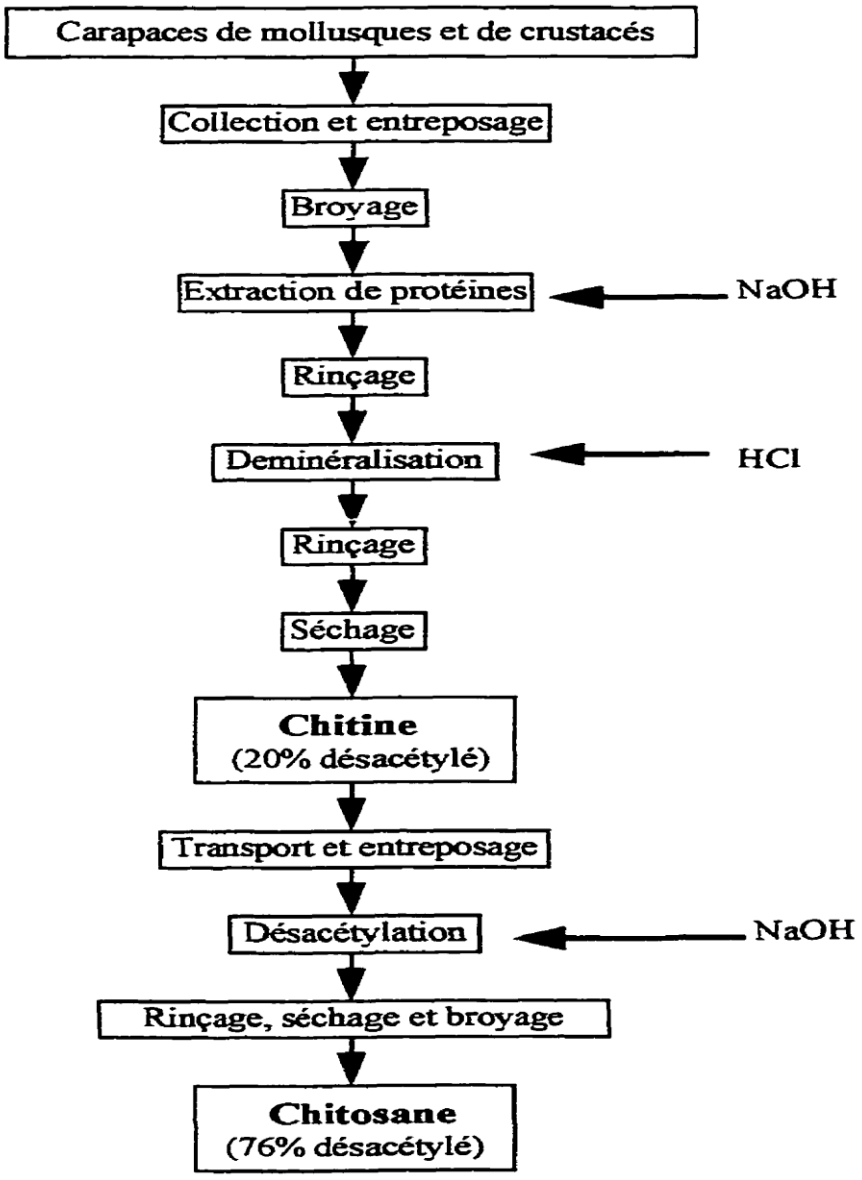


Figure 4 : Méthode de production du chitosane **(Onsoyen et Skaugrud,1990*).***

I.2.3.3.1.4. Valorisation et traitement de la chitine brute

Laproduction typique du chitosane à partir de carapaces de crustacées comporte généralement quatre étapes de base: la déminéralisation, la déprotéinisation, la décoloration et la désacétylation **(No et Meyers, 1995; No et *al*., 2003).**

I.2.3.3.1.4.1. La déminéralisation

Elle est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique, à des concentration de 1 a 10 Moles.L^{-1}. La durée du traitement acide est de l'ordre de 1 à 48h à température ambiante **(Suyatma, 2006).**

I.2.3.3.1.4.2. La déprotéinisation

A l'état naturel, la chitine se présente sous forme associée à des protéines (chitinoproteine) qui sont éliminées par un traitement alcalin en utilisant, généralement , des solution à base de NaOH , Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH , K_2CO_3 , $Ca(OH)_2$, Na_2SO_3 , $CaSO_3$, ou Na_3PO_4; avec des concentrations allant de 0.1 à 5 Moles.L^{-1}. La solution d'hydroxyde de sodium est la plus souvent utilisée pour dissoudre les protéines. La durée de ce traitement alcalin est de l'ordre de 0.5 à 72h à haute température (65 -100°C) **(Suyatma, 2006).**

I.2.3.3.1.4.3. La décoloration

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des carapaces de crustacées doit être décolorée après les traitements acide et alcalin **(No et *al.*, 1989).** Le pigment des carapaces de crustacées forme un complexe avec la chitine e laquelle il peut être dissocié par des solvants comme l'éthanol, l'éther **(Youn et *al*., 2007),** une solution d'hypochloride de sodium NaOCl **(No et *al*., 1989),** duperoxyde d'hydrogene H_2O_2**(Moorjani et *al.*, 1975; Brine et Austin, 1981).**

I.2.3.3.1. 4.4. La désacétylation

La desacétylation signifie l'hydrolyse des groupements acétyls présents dans la chitine pour avoir des groupes amines. La chitine peut être convertie en chitosane par désacétylation

alcaline homogène ou hétérogène. La plupart des méthodes utilisent de la soude (NaOH) ou du Hydrazine (NH_2-NH_2), ou par désacétylation enzymatique (fig.5) **(Chang et *al.*, 1997)**.
Les quatre étapes citées ci-dessus sont souvent empiriques et variables avec le degré de minéralisation des carapaces, les saisons et les conditions de température **(Muzarrelli et Muzarrelli, 1995)**.

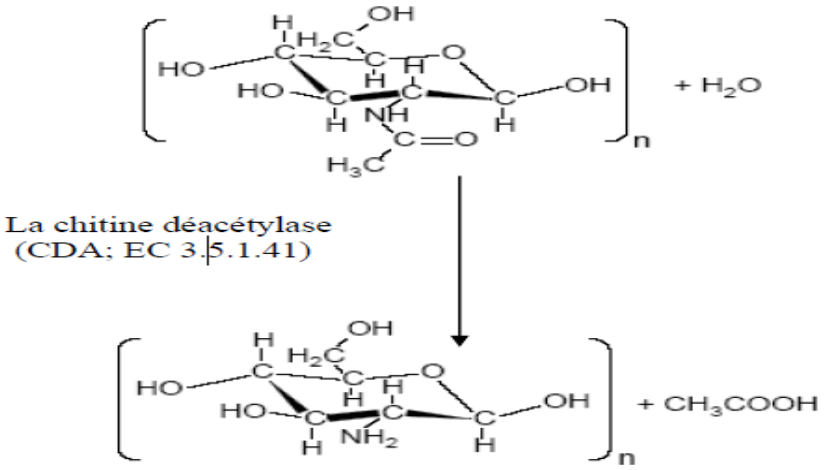


Figure 5 : La desacétylation enzymatique de la chitine **(Chang et *al.*, 1997).**

I.2.3.3.1.5. les principales sources de la chitine

En plus de chez les crustacés et les insectes, la chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues chlorophycées, levures et bactéries (**Shahidi et Abuzaytoun, 2005**) chez lesquelles, elle maintient la rigidité de la cellule et contribue au contrôle de la pression osmotique.

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (tableau 6), elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes. Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas récupérés. La production de chitine à partir de carapaces de crevettes permet de valoriser ces déchets de l'industrie agroalimentaire pour éviter leur rejet à la mer et ne pas engendrer de pollution car ces carapaces qui renferment environ 30-40% de

protéine, 30-50% de carbonate de calcium, et 20-30% de chitine par rapport au poids sec **(Tolaimate et *al.*, 2003)**.

Tableau 6: Sources potentielles de chitine **(Mathure et Narang, 1990)**.

Source de chitine	Teneur en chitine (%)
Crabe marbré (*Grapsusmarmoratus*)	10
Crabe rouge (*Portunuspuber*)	10
Le crabe commestible	70
Crabe araignée (*Maia squinada*)	16
Homard sauterelle (*Scyllarusarctus*)	25
Langouste (*Palinurus vumgarisus*)	32
Crevette (*Palaemonfabricius*)	44
Seiche (*sepiaoffinalis*)	20
Calmar (*Loligovulgaris*)	40
Champignons - *Mucor* rouxili - *Aspergillusniger* - *Aspergillusphoenisis*	 9.4 42 23.7

I.2.3.3.1.6. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane

I.2.3.3.1.6.1. Les degrés de desacétylation et d'acétylation

Le degré d'acétylation (DA) exprime le taux de groupes acétyls par rapport au taux de groupes non acétylés (NA en %) (fig.6) **(Jalal, 2005)**:

DA en % = 100 - NA

Le degré de désacétylation (DD) est l'une des propriétés les plus importantes du chitosane, car il influe, non seulement sur ses caractéristiques physico-chimiques; mais aussi sur sa biodégradation et son activité immunologique **(Chalet et *al*., 2001).**

De nombreuses méthodes ont été développées pour la détermination du DD, y compris la spectroscopie infra rouge (SIR) **(Vishu Kumar et *al.*, 2004),** la spectroscopie UV, la résonnance magnétique nucléaire (RMN), la titration colloidale et la titration potentiométrique **(Jiang et *al.*, 2003).** Cependant, la méthode la plus simple est la SIR proposée par **Khan et *al.*, (2000)** qui exprimele degré de désacétylation (DD) par la formule suivante**:**

$$DD = 100 - ([A / (W-204A) / 161 + A] \times 100)$$

Ou A est la qantité de N-acétylglucosamine detreminée /204 et W est la masse de chitosane utilisée.

La methode decrite par **Domszy et Robert (1985)** est appliquée pour la determination du dgré d'acetylation par spectroscopie infrarouge , ou les absorbnces sont liées aux bandes de 1655cm^{-1}pour l'amide I, et 3450cm^{-1} pour les groupes hydroxyles Le facteur 1.33 représente le rapport ($A_{1655}cm^{-1}$/ $A_{3450}cm^{-1}$) pour un chitosane entièrement N-acétylé.

Le Degré d'acetylation DA est determiné par l'equation suivante :

$$DA\ en\ \% = (A_{1655}cm^{-1} / A_{3450}cm^{-1}) * 100/1.33$$

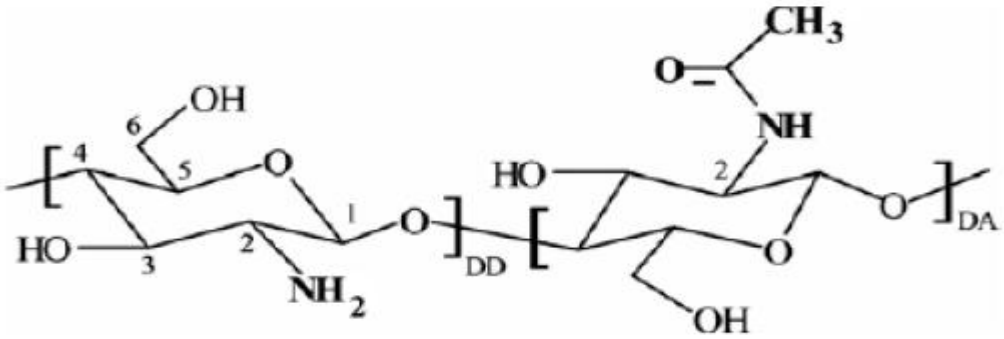


Figure 6: Les unités de répétitions structurales de la chitine et du chtiosane**(Jalal, 2005)**.

I.2.3.3.1.6.2. La viscosité

La mesure de la viscosité du chitosane peut être basée par la présence possible de microgels ou d'agrégats favorisés par les liaisons hydrogène, le vieillissement des solutions et des effets électrostatiques (dus aux charges des groupes amines-amine protonès).
La viscosité du chitosane dépend de:

- Degré désacétylation : plus il est dèsacètylè, plus il y a des groupements amines libres, donc le chitosane est soluble et par conséquent sa viscosité est importante
- La concentration : la viscosité augmente en fonction de la concentration
- La température : comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.
- Le pH : plus il est important plus la viscosité est forte **(Amiali ,1999**).

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer de la viscosité. La plus employée est la viscosimétrie. la viscosité « η » d'une solution de chitosane s'exprime par la relation de Mark-Houwink et Sukurada (donner la référence source de cette relation ici) : $\eta = K.M^{a}$
où :

M est la masse moléculaire viscosimétrique. Selon les solvants, les constantes « K » et « a » de cette relation ont différentes valeurs, mais on se réfère en général à la loi de (**Roberts, 1992**) qui leur attribue les valeurs suivantes : $K = 1.81.10^{-3}$ et a = 0.93.

I.2.3.3.1.6.3. Cristallinité

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles **(Rinaudo, 2006**).

La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X (**Roberts, 1992)**.

En fait, le chitosane est généralement une substance semi-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus: le chitosane I (faible DD, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane II (fort DD, forme amine libre) (**Kurita, 2006)**.

I.2.3.3.1.6.4. Le poids Moléculaire

Le poids moléculaire (PM) d'un polymère est une caractéristique très importante qui dépend essentiellement de la masse de son monomère est du nombre de monomères qui constituent le polymère. La détermination du PM d'un chitosane se fait par la relation de Mark-Houwink et Sukurada (**cités par Kassai, 2007**).

$$[\eta] = K.(PM)^{a}$$

Où`:

[η] : la viscosité intrinsèque.

PM : poids moléculaire moyen.

a et K : constantes dépendantes du système solvant-soluté et de sa température.

I.2.3.3.1.6.5. Solubilité

La chitine est soluble dans très peu de solvants, sa masse molaire initiale est de l'ordre de 800 000 a 10^6 g.Mole^{-1} et elle est généralement acétylée. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200 000 g. Mole^{-1} et un DA allant de 2 à 25%.

Pour le chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaine sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée. Il convient de remarquer que la répartition en pourcentage n'est pas la seule à influer sur les propriétés du polymère.

La répartition de ces différents motifs N-acétylés le long de la chaine est également importante **(Varum et *al.*, 1991)**.En effet, un enchainement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et par conséquent il modifie sa solubilité.

La chitosane est insoluble dans l'eau, dans les acides concentrés, les bases et les solvants organiques;ce sont ses propriétés acido-basiques qui permettent sa dissolution facile dans les acides organiques dilués grâce à la protonation de ses groupes amines suivant l'équilibre:

$$R\text{-}NH_2 + H_3O^+ \leftrightarrows R\text{-}NH_3^+ + H_2O$$

Le chitosane est ainsi soluble dans tous les acides minéraux dilués comme les acides chlorydrique, nitrique, phosphorique; à l'exception de l'acide sulfurique **(Varum et *al*., 1991).** Il est aussi soluble dans les acides organiques tels que les acides carboxyliques branchés comme l'acide tartrique, l'acide citrique et l'EDTA qui peuvent être adsorbés par le chitosane **(Gyliené et *al*., 2008)**.

I.2.3.3.1.7. Domaine d'utilisation du chitosane

La chitine et le chitosane possèdent de nombreuses propriétés physicochimiques et biologiques intéressantes (biocompatibilité, bioactivité, biodégradabilité), qui laissent entrevoir de nombreuses applications potentielles.Le chitosane a suscité plus d'intérêt que la chitine. C'est ainsi que leur utilisation dans les secteurs économiquement porteurs comme les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques et agricoles, etc…, a fait l'objet de nombreux brevets (tableau 7) **(Rinaudo, 2006)**.

Tableau 7: Applications du chitosane **(Rinaudo, 2006)**.

Utilisations	**Rôles précis**
Traitement des eaux usées	- Agent coagulant et chélatants; - Réduction des métaux réutilisables; - Agent de déshydratation des boues.
Traitement de l'eau potable	- Agent coagulant et chélatant; - Réduction des métaux toxiques; - Enlèvement du fer et du manganèse des piscines.
Agriculture	- Contrôle des métaux essentiels à la croissance des plantes.
Alimentation	-Extraction du fer (catalyseur de l'oxygène des acides gras insaturés, causant des mauvaises odeurs dans les viandes précuites) - agent antibactérien.
Domaine biomedical et pharmaceutique	-Diminution du taux de cholestérol; -Accélération de la guérison des blessures; -Stimulation du système immunitaire; -Agent antibactérien et anti-tumeur.
Industrie des cosmétiques	Agent hydratant.
Photographie	Extraction de l'argent.
Industrie textile	Agent de rétention d'eau.
Pates a papier	Augmentation de la résistance du papier à la déchirure.

I.2.3.3.1.7.1. Biomédicale

La biocompatibilité du chitosane se traduit par son antigénicité, son innocuité et son hémocompatibilité. Son innocuité est illustrée par une dose limite administrable par voie orale de 17 g/kg/jour. L'hémocompatibilité se manifeste par un caractère antithrombogène tout en étant un hémostatique local. Il trouve de ce fait des applications en revêtement d'objets devant être mis en contact avec le sang comme les prothèses vasculaires ou les valves cardiaques. Sa bioactivité est due principalement à son activité biostimulante qui lui donne aussi la propriété d'accélérer la cicatrisation **(Ribeiro et *al.*, 2009)**.

Ces propriétés cicatrisantes sont utilisées pour fabriquer des fils de suture ou une peau artificielle. Le chitosane est aussi antifongique et bactériostatique. C'est un spermicide efficace et il offre de bonnes conditions d'asepsie.

D'autres applications biomédicales du chitosane ont également été étudiées, comme les substituts osseux **(Ribeiro et *al.*,2009; Muzzarelli, 2010)**, les interactions sanguines **(Ribeiro et *al.*, 2009; Kim et Jung, 2010)**, les implants **(Khor et Lim, 2003)**, ou les anti-inflammatoires **(Berthold et *al.*,1996; Je et Ahn, 2010),** et médicaments anticancéreux **(Nam et *al.*, 2007).** Sa biodégradabilité est obtenue grâce à des chitosanases et chitinases présentes dans de nombreuses cellules bactériennes , les champigons, les crustacées et les insectes .

I.2.3.3.1.7.2. Cosmétique

Le chitosane peut être utilisé à la fois comme agent hydratant, mouillant, tensioactif, épaississant, microencapsulant et/ou antimicrobien dans une même formulation cosmétique **(Crini, 2006).** Compte tenu de la structure chimique du chitosane, il présente l'avantage, contrairement à la majorité des produits classiques, de posséder un caractère polycationique. De ce fait, les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la macromolécule de chitosane. C'est le cas des protéines de la peau, des lipides, des tensioactifs, des détergents et des graisses du cheveu (**Rinaudo, 2006).** De plus, comme la plupart des polysaccharides, le chitosane, en raison de la liaison glycosidique, est un polymère semi-rigide et donc un bon épaississant. Il a la possibilité de former des ponts hydrogène inter-macromoléculaires qui augmentent encore ses performances allant jusqu'à avoir un comportement de type gel physique (**Desbrières, 2002).**

I.2.3.3.1.7.3. Agriculture

Le chitosane peut également trouver des applications dans le domaine agricole. Les matériaux encapsulés à base de chitosane se retrouvent également dans des produits agricoles (**Ravi Kumar, 2000; Bautista-Banos et *al.*, 2006**) (tableau 8).

Tableau 8 : Applications du chtisoane dans le domaine agricole **(Ravi Kumar, 2000).**

Enrobage de semences (encapsulation)
Immobilisation cellulaire (horticulture)
Fongicide (bio-pesticide)
Fertilisant
Protection des cultures
Traitement des sols
Contrôle des métaux essentiels à la croissance des plantes
Alimentation et vaccination animale

I.2.3.3.1.7.4. Traitement des eaux

Les propriétés polyélectrolytes, chélatantes et complexantes du chitosane en font un bon candidat pour des applications environnementales dans le domaine du traitement des eaux usées (**Gerente et *al.*, 2007**).

Ces applications sont basées sur le caractère polycationique du chitosane en milieu acide et sur sa solubilité qui ouvre la voie à de nombreuses applications dans le domaine de la coagulation-floculation, de la chélation, de l'adsorption ou de l'ultrafiltration. En effet, ses groupements amines protonés en milieu acide sont capables de fixer tous les métaux de transition et les radionucléides (**Domard et Piron, 2000; Piron et *al.*, 1997)** (tableau 9).

Le chitosane peut être utilisé comme agent coagulant, chélatant ou adsorbant pour complexer une large gamme de polluants comme les molécules aromatiques et phénoliques,

les colorants organiques (effluents agroalimentaires, papetiers et textiles) (**Crini, 2006; No et *al.*, 2000)**.

Une autre application récente consiste à immobiliser des microorganismes ou des boues dans des matrices polymères à base de chitosane pour traiter les eaux usées, toujours sur le même principe de l'encapsulation **(Krajewska, 2005)**.

Tableau 9: Les applications du chitosane dans le domaine de l'environnement (**Gerente *et al.*, 2007)**.

Champ d'application	Applications
Traitement de l'eau potable	Ingénierie de l'eau (coagulation /floculation, filtration, adsorption)
Traitement des eaux usées	Agent coagulant
Traitement des eaux de piscines	Agent chélatant de cations
Chélation des métaux lourds	Réduction des métaux toxiques et radio-isotopes
Récupération des métaux précieux	Récupération de métaux réutilisables
Decoloration des eaux	Agent décolorant
Filtration membranaire	Enlèvement du fer et du manganèse des piscines
Traitement des boues	Agent de déshydratation des boues

Différentes techniques sont généralement appliquées aux traitements des eaux, telles que l'adsorption, la floculation ou les traitements biologiques. Le chitosane peut être utilisé à des fins d'adsorption **(Crini, 2005; Crini,2006)** et de floculation **(Renault et *al.*, 2009)**. Le fait qu'il s'agisse d'un composé écologique très abondant et plutôt bon marché en fait une solution de choix dans certains cas.

Ainsi, le chitosane s'est avéré particulièrement efficace pour la floculation des effluents biologiques secondaires des cartonnages **(Renault et *al.*,2009)**. Malheureusement, les applications réelles dans l'industrie restent plutôt rares, car les agents floculant concurrents sont moins chers.

I.2.3.1.2. Les biofilms

I.2.3.1.2.1. Définition et historique

L'adhérence desbactéries à des surfaces est un phénomène universellement connu. Le terme de biofilms a été utilisé pour la première fois en 1943 par **Zobell (1943)**. Il n'existe pas de réel consensus sur la définition du terme «biofilm» et il existe des différences suivant les auteurs. Nous avons retenu la définition de **Sutherland (2001a**): « un biofilm est une communauté de microorganismes (bactéries, champignons, autres) fixéeà une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice».Van Leeuwenhoek, considéré comme l'un des fondateurs de la microscopie, fut le premier à observer des microorganismes issus de grattages de sa propre surface dentaire dans les années 1670. Il est donc considéré comme la personne ayant découvert les biofilms. En **1940**, **Heukelekian et Heller** mirent en évidence « l'effet bouteille» consistant en une croissance et une activité métabolique de microorganismes marins renforcées par la présence d'une surface à laquelle ils peuvent s'attacher. Il s'en est suivi de nombreuses études sur les biofilms récemment répertoriées par **Hoiby (2014).**

Il n'est pas facile donc de donner une définition que l'on peut considérer comme juste et complète de ce que sont les biofilms. En effet, ils sont le résultat d'un processus cyclique systématique complexe qui comprend le transport et l'adsorption de particules organiques et inorganiques ainsi que de microorganismes sur une surface humide, et, ensuite la production d'EPS (exopolysaccharides), biopolymères qui sont impliqués dans le processus de fixation du biofilm **(Das et *al*., 2013)**.

Les biofilms, communément, couvrent les surfaces submergées dans les systèmes des eaux, possèdent la capacité de modifier le transport et l'accumulation des substances telles que les éléments nutritifs et les particules en suspension dans l'eau **(Barranguet et *al.*, 2004).**

I.2.3.1.2.2. Composition du biofilm

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les microorganismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent 2 à 15% du matériel du biofilm; alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique carbonée d'un biofilm **(Sutherland, 2001b)**.

L'organisation d'un réseau de canaux aqueux au sein du biofilm permet l'acheminement de l'oxygène et des nutriments entre les microcolonies et vers les régions les plus enfouies, ainsi que l'évacuation des déchets. Toutefois, un gradient de nutriments et d'oxygène existe depuis la superficie vers la profondeur du biofilm, où l'environnement devient plus propice aux organismes évoluant en anaérobiose. Ainsi, l'état métabolique d'une bactérie au sein du biofilm peut être directement dépendant de sa localisation à l'intérieur de la structure **(Clutterbuck et *al.*,2007 ; O'Toole et *al.*, 2000)**.

Le rapport C/N (carbone /azote) d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice .Cette matrice est fortement hydratée et est formée essentiellement des exopolysaccharides (EPS). L'expression «substances polymériques extracellulaires» regroupe différentes classes de macromolécules présentes à l'intérieur des biofilms: des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des lipides et d'autres macromolécules dites substances humiques (ce sont essentiellement les sécrétions de haut poids moléculaire) ainsi que les produits des lyses cellulaires et de l'hydrolyse de macromolécules. Des composants inorganiques ont été également trouvés dans la matrice extracellulaire (tableau 10).

La composition des EPS est très différente d'un biofilm à l'autre. Elle dépend de la nature des microorganismes présents dans le biofilm, de l'âge du biofilm et des différents facteurs environnementaux comme les forces hydrodynamiques, la température et la disponibilité de nutriments et leur nature **(De Chalvet De Rochemonteix, 2009)**.

La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural important et ses propriétés physico-chimiques sont variables d'un biofilm à l'autre. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet à certains biofilms de lutter contre la dessiccation dans le milieu naturel, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages.

Tableau 10: Principaux constituants de la matrice du biofilm **(Sutherland, 2001b)**.

Constituants	En % de la matrice
Eau	Jusqu'a 97%
Cellules de microorganismes	2 - 5 % (plusieurs especes)
Polysaccharides (homo and héteropolysaccharides)	1-2% (neutra et polyanionique)
Protéines (extracellulaires et resultants de la lyse)	< 1-2 % (plusieurs, y compris enzymes)
AND et ARN	< 1-2 % (from lysed cells)
ligand d'une enzyme	(liées et libres)

La matrice joue un rôle majeur dans les propriétés de résistance aux biocides des biofilms, en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm **(Donlan et Costerton, 2002; Donlan,2002)**.

I.2.3.1.2.3. Formation des biofilms et facteurs d'influence

I.2.3.1.2.3.1. Formation des biofilms

La formation d'un biofilm est influencée par un certain nombre de facteurs environnementaux comme la nature de la surface, le milieu et les microorganismes. Il est admis que ces facteurs interviennent dans 5 processus successifs et cycliques amenant à la formation d'un biofilm dit « actif mature» (fig.7) **(Donlan,2002)**.

- Le transport des bacteries vers leur support,
- L'adhésion réversible des microorganismes, caractérisée par desinteractions non spécifiques où les cellules peuvent etres facilement décrochées par un rinçage doux,
- L'adhésion irréversible, caractérisée par des interactions spécifiques entre le support et la bactérie via le pili, les adhésines ou les exopolysaccharides,
- La maturation du biofilm et la sécrétion de matrice extracellulaire,
- Le détachement des cellules.

Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon réversible par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals: on parle d'adhérence (fig.7a) **(Golovlev, 2002; Van Houdt et Michiels, 2005)**. Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pili, et synthétisent une matrice d'exopolysaccharides: il s'agit de la phase d'adhésion (fig.7b). On distingue ensuite des phases de croissance (fig.7c) et de maturation du biofilm (fig.7d). Ensuite, sous l'effet de facteurs environnementaux,les bactéries vont se détacher du biofilm(fig.7e), et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant: on parle d'essaimagedu biofilm **(Clutterbuck et *al.*, 2007)**.

Les cellules planctoniques s'approchent de la surface et s'y attachent; d'où un comportement rotationnel a été observé jusqu'à une demi-heure sur la surface puis la rotation ralentit et cesse peu à peu, entraînant un attachement longitudinal irréversible **(Rice et *al.*, 2000).** Après l'attachement, les cellules bactériennes se réunissent pour former des microcolonies **(Stanley et Lazazzera,2004)**, par la suite une division cellulaire se produit donnant naissance à deux cellules filles **(Rice et *al.*, 2000)**.Les processus impliqués dans les événements initiales de la formation de biofilm comprennent ; le transport et l'adsorption des cellules vers la surface,la transformation de ces cellules de réversible vers une adsorption irréversible , désorption de cellules adsorbées de manière reversible **(Rice et *al.*, 2000)**.

Des microcolonies, qui sont des communautés de cellules bactériennes de trois à cinq couches de profondeur, se développent suite à l'adhésion des cellules bactériennes à une surface. Les polysaccharides jouent un rôle dans l'adhésion bactérienne et cela suggère que le matériel extracellulaire est responsable de la fixation des bactéries à la surface.

Après les premières étapes d'attachements et de formation des microcolonies, la structure d'un biofilm mûr peut se former (**Stanley et Lazazzera, 2004)**.

La formation des biofilms est largement tributaire de l'intégration des processus physiques, chimiques et biologiques. Dans un premier temps, certaines cellules sont transportées en suspension de liquide à un transporteur de surface par des mouvements physiques. Dans un deuxième temps, les premières forces attractives, qui sont des forces physiques et des forces chimiques, retiennent les cellules sur le support de surface et promeuvent la stabilité des contacts multicellulaires. Dans un troisième temps, la force microbienne ne concerne que les cellules attachées mûres.Enfin, le biofilm sera finalement

déterminé par la force de cisaillement hydrodynamique pour donner des communautés structurées.

Dans les meilleures circonstances, les biofilms peuvent se développer dans un delai de jours, en outre le plus grand taux de dilution et de biomasse attachée font croitre les biofilms plus rapidement ; tandis que le détachement de la biomasse influence grandement la formation et la stabilité de biofilm. **(Chen et Chai, 2005).**

Les batonnets rouges représentent les bactéries à l'état planctonique et ceux figurés en beige à l'état de biofilm. Ce dernier est représenté en beige. Les cinq stades successifs du passage d'un de ces états à l'autre sont schématisés et indiqués par les lettres (a), (b), (c), (d) et (e).

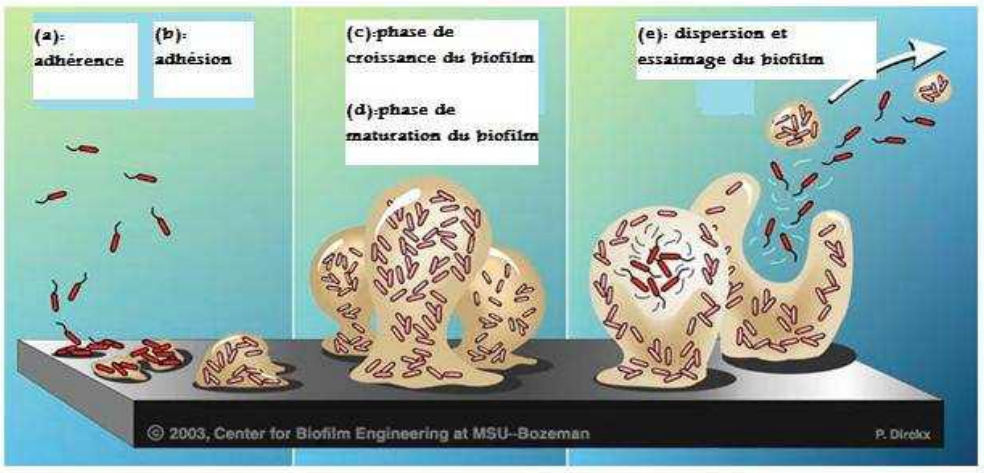


Figure 7: Cycle de développement simplifié d'un biofilm **(Donlan, 2002)**.
D'après [http://www.biofilm.montana.edu], avec accord du Montana State University Center for Biofilm Engineering.

I.2.3.1.2.3.2. Les facteurs influençant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe qui est sous l'influence de nombreux facteurs: caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules **(Donlan, 2002)**.

I.2.3.1.2.3.2.1. La surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm **(De Chalvet De Rochemonteix, 2009)**.

I.2.3.1.2.3.2.2. Les caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux tels que le pH, la température, concentration en oxygène et en nutriments et aussi la source de carbone disponible **(Donlan *et al.*, 2002; Casadevall et Marling, 2007; Spormann, 2008)**.

I.2.3.1.2.3.2.3. Les propriétés des cellules

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface: flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y voir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situées à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exoploysacchardies et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles **(Donlan ,2002)**.

I.2.3.1.2.4.Les biofilms dans le traitement des eaux usées

Le traitement des eaux usées avec des systèmes de biofilms présente plusieurs avantages par rapport aux systèmes de croissance en suspension. Une flexibilité opérationnelle, un faible encombrement, un temps de rétention hydraulique réduit, une résilience aux changements de l'environnement, un temps de séjour en biomasse accru, une concentration élevée en biomasse active, une capacité améliorée à dégrader les composés récalcitrants ainsi qu'un taux de croissance microbien plus lent entraînant une production de

boues plus faible en sont quelques-uns des avantages des procédés de traitement des biofilms **(Lazarova et Manem, 2000; Chen et Chen, 2000; Wilderer et McSwain, 2004).**

Les systèmes de biofilms permettent également un meilleur contrôle des taux de réaction et de la dynamique des populations **(Lazarova et Manem, 2000)**. Les configurations de réacteurs à biofilms appliquées au traitement des eaux usées comprennent des filtres ruisselants, des filtres à média plastique à haut débit, des contacteurs biologiques rotatifs, des réacteurs à biofilms à lit fluidisé, des réacteurs de transport aérien, des filtres granulaires et des réacteurs à cellules immobilisées sur membrane **(Lazarova et Manem, 2000)**.

Une division générale entre les processus à lit fixe et mobile en fonction de l'état du matériau de support est généralement effectuée. Les systèmes à lit fixe comprennent tous les systèmes dans lesquels le biofilm est formé sur des supports statiques tels que des roches, des profils en plastique, des éponges, des supports granulaires ou des membranes **(Lazarova et Manem ,2000)**. Le flux de liquide à travers les milieux statiques fournit aux microorganismes des nutriments et de l'oxygène.

Les systèmes à lit mobile comprennent tous les processus de biofilms avec des milieux en mouvement continu, maintenus par une vitesse élevée de l'air ou de l'eau ou une agitation mécanique **(Rodgers et Zhan, 2003)**. Le matériau porteur du biofilm (support) est sélectionné en fonction de sa taille, de sa porosité, de sa densité et de sa résistance à l'érosion (**Christensson et Welander,2004; Ødegaard et *al.*, 2000)**. En utilisant un matériau ayant une grande surface spécifique (m^2 / m^3), une activité biologique élevée peut être maintenue en utilisant un volume de réacteur relativement petit. L'épaisseur du biofilm dans les réacteurs est généralement contrôlée en appliquant une force de cisaillement, qui est obtenue en modifiant l'intensité d'agitation, la vitesse d'écoulement ou par lavage à contre-courant **(Rodgers et Zhan,2003)**.

Outre le traitement primaire, secondaire et tertiaire des eaux usées, des systèmes de biofilms ont également été utilisés avec succès pour traiter les eaux usées industrielles. Les biofilms utilisés dans le traitement des eaux usées bénéficient d'un certain nombre de mécanismes d'élimination tels que la dégradation biologique, biosorption, bioaccumulation et biominéralisation **(Singh et *al.*, 2006)**.

Une biosorption efficace des métaux lourds **(Guibaud et *al.*, 2006)** et des solvants organiques **(Späth et *al.*,1998)** par les composants de la matrice de biofilms a été trouvée. Des réacteurs utilisant la flore microbienne naturelle ou des souches spécifiques ayant la capacité d'éliminer, par exemple, les chlorophénols **(Chang et *al.*,2004; Zilouei et *al.*,2006)**, le pyrène et le phénanthrène **(Eriksson et *al.*,2002)**, les n-alcanes **(Yamaguchi et *al.*,1999)**, le tétrachlorure de carbone **(Jin et Englande,1998)** et les effluents mixtes de l'industrie pharmaceutique **(Rosén et *al.*,1998)** ont été décrits dans la littérature.

L'utilisation de souches bactériennes spécifiques pour améliorer les performances du traitement des eaux usées est appelée bioaugmentation. **Stephenson et Stephenson (1992)** ont défini la bioaugmentation comme un processus qui tente d'améliorer le traitement en augmentant la diversité et / ou l'activité grâce à une introduction directe de microorganismes naturels ou génétiquement modifiés sélectionnés dans le système. Pour parvenir à une bioaugmentation réussie, la survie, l'activité et la rétention des microorganismes inoculés doivent être garanties dans le nouvel environnement **(Van Limbergen et *al.*, 1998)**.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Chapitre II: Matériels et Méthodes

II.1. Matériels

II.1.1.Matériel biologique

II.1.1.1.La carapace de crevette comme source de chitine et de chitosane

Les carapaces de crevette utilisées dans cette étude proviennent d'une espèce de crevette rouge *Aristeus antennatus* collectée au niveau des pêcheries de la wilaya de Mostaganem.

II.1.1.2. Le criquet pèlerin comme source de prélèvement des souches bactériennes

L'espèce de criquet pèlerin utilisée comme source de prélèvement des souches bactériennes a été collectée au niveau de la région sud de la wilaya de Tiaret.

II.1.2. Matériels d'analyse

II.1.2.1. Solvants et réactifs utilisés

Les solvants et les réactifs utilisés dans ce protocole sont les suivants :

- Sel de Nickel (Nickel (II) chloride Hexahydrate) : $NiCl_2*6H_2O$ (MERCK);
- Sel de cobalt (Cobalt (II) chloride Hexahydrate) : Cl2Co* 6H2O (MERCK);
- Bleu de méthylène: $C_{16}H_{18}CLN_3S$ (Sigma Aldrich);
- Rouge congo $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ (Sigma Aldrich);
- Solution d'acide chlorihydrique (HCl) : DP 40 %. (Sigma Aldrich);
- Solution de la soude (NaOH) concentré : DP 95%.(Sigma Aldrich);
- Tripolyphosphate de sodium (STPP) $Na_5P_3O_{10}$. (Sigma Aldrich);
- Acétone ;
- Ethanol, DP 95%.

II.1.2.2. Appareillage

La nature des appareils d'analyse et de mesure utilisés dans cette expérience est la suivante :

- Spectroscopie infra rouge de Fourier FTIR du (Shimadzu IRPrestige-21, Japon);
- Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Royaume-Uni);

- Microscope elecotronique à balayage additionné de EDS SEM-EDX couplé à un spectroscope à rayons X (Philips XL 30 SFEG, France) ;
- Spectrophotomètre à plasma avec couplage inductif (ICP) (Perkin Elmer Optima 7000 DV, Germany);
- Etuve Memmert IN30 plus (Germany);
- Spectrophotomètre UV-Vis (Hach Lange, DR 2800, France);
- Centrifugeause Rotofix 32A (Hettich, Germany);
- pH mètre HANNA HI83141 (France).

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction de la chitine et préparation du chitosane

Le diagramme de préparation des adsorbants est reporté sur la figure 8. Les crevettes sont étêtées et leurs carapaces récupérées pour être soigneusement lavées à l'eau courante afin d'éliminer les déchets indésirables et les impuretés supplémentaires. Elles sont ensuites séchées dans un four à 105°C jusqu'à ce qu'un poids fixe soit atteint avant d'être broyées et séparées pour obtenir des particules de taille inférieure à 250 µm **(Percot et *al.*, 2003; Sagheer et *al.*,2009)**.

Les carapaces ont été durcies avec une solution de HCl 0.25M à la température ambiante avec un rapport de 1/40 (P/V : 1g de carapace pour 40mL de HCl), le solide et les minéraux à l'intérieur des carapaces de crevette sont dissous dans le HCl pendant ce processus de déminéralisation **(Percot et *al.*, 2003; Sagheer et *al.*,2009)**. La déminéralisation permet de minimiser la teneur en cendres et les carbonates et phosphates présents dans le solide. L'eau distillée a été utilisée pour nettoyer ce solide créé pour éliminer les minéraux dissous et l'excès de HCl. Ensuite, l'échantillon solide a été placé dans un four à 105°C jusqu'à ce qu'un poids fixe soit atteint.

La poudre de carapaces de crevette déminéralisée a été obtenue en traitant la poudre de crevette obtenue lors des étapes précédentes avec une solution de NaOH 1M sous chauffage à 70°C avec un rapport solution/ solide de 20 $mL.g^{-1}$. Dans ce processus, la soude provoque l'hydrolyse des protéines du solide en acides aminés hydrosolubles. Cette opération a été répétée de nombreuses fois jusqu'à ce qu'aucune couleur ne soit apparente pour signifierl'épuisement des protéines du solide.

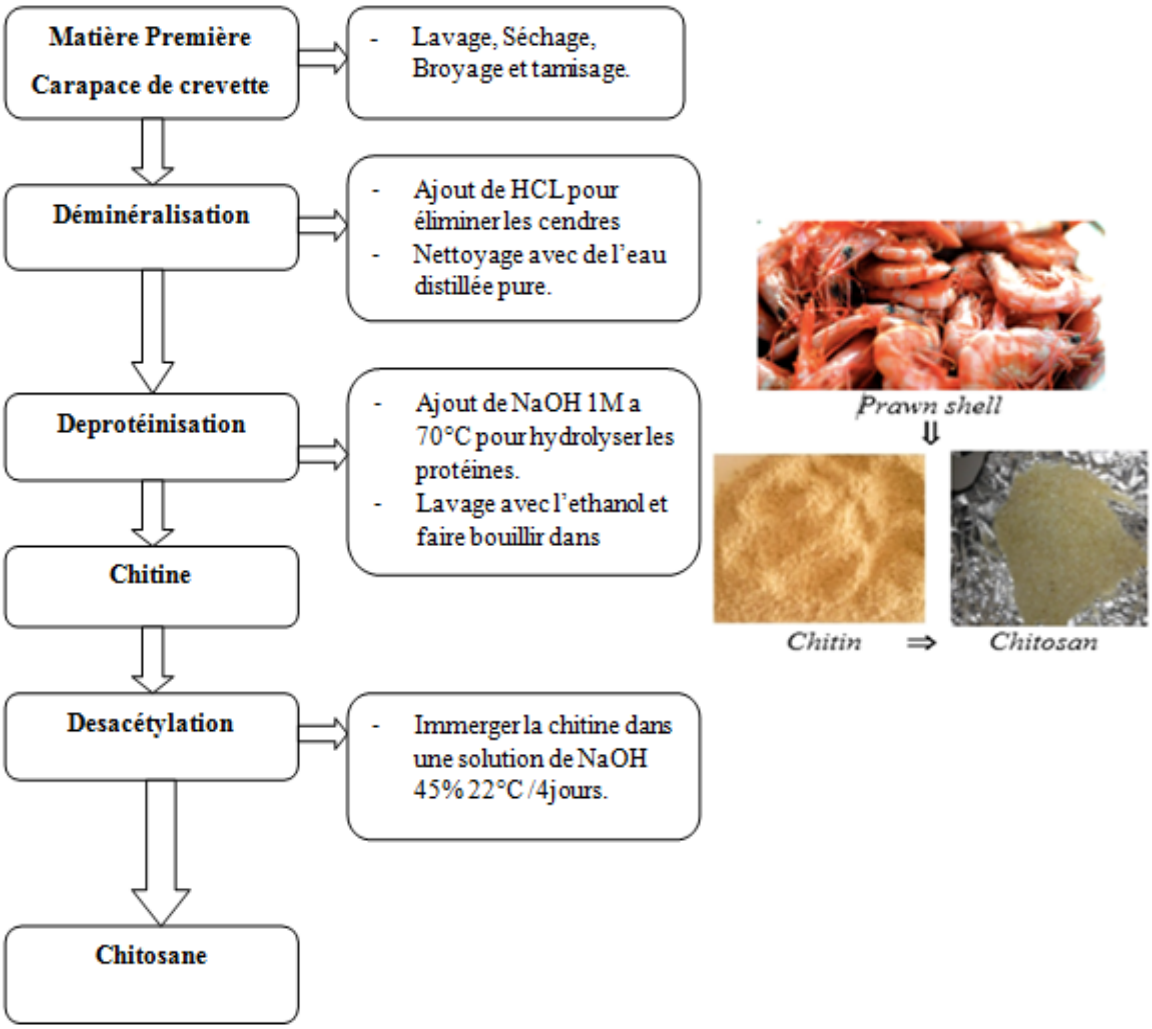


Figure 8 : Préparation du chitosane a partir des carapaces de la crevette (**Rahali et *al.*, 2020)**.

Le solide résultant a ensuite été lavé pour devenir neutre afin d'éliminer les protéines en suspension et l'excès de NaOH **(Dos Anjos et *al.*, 2002; Saha et *al.*,2005).**Ensuite, les échantillons ont été séchés dans le four à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après cette étape, la poudre résultante a d'abord été lavée avec de l'éthanol chaud (rapport solution / solide de 10 $mL.g^{-1}$) et ensuite bouillie dans de l'acétone (rapport solution/solide de 10 $mL.g^{-1}$) pour éliminer d'autres petites quantités d'impuretés pouvant être présentes dans les

carapaces de crevettes **(Rinaudo , 2006)**. L'eau distillée a été utilisée pour nettoyer la poudre purifiée (chitine) puis séchée au four à 105ºC jusqu'à un poids fixe.

La dernière étape est la préparation du chitosane connue sous le nom de desacetylation et qui consiste à convertir la chitine en chitosane par l'élimination des groupes acétyls. La chitine a été immergée dans une solution de NaOH à 45% (rapport solution / solide de 15 $mL.g^{-1}$) à 22 °C pendant 4 jours, puis lavée à l'eau distillée jusqu'à pH 7 et séchée dans le four à 105 °C jusqu'à un poids constant **(Rinaudo, 2006).** Le degré de désacétylation de chitosane a été évalué en utilisant le spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) dans la plage de 500 à 4000 cm^{-1}.

II.2.2. Préparation du nanochitosane à partir de la chitine

La préparation du nanochitosane à partir de la chitine a été réalisée selon la méthode décrite par **Tang et *al*.(2007).** Cela consiste à dissoudre 20 mg de chitosane dans 40 mL d'acide acétique à 2% (v/v) et à y ajouter lentement sous agitation 20mL d'une solution de tripolyphosphate de sodium à 0,75 mg/mL.

II.2.3. Isolement et identification des souches bactériennes à partir du criquet Pèlerin

II.2.3.1. Isolement des bactéries *sphingomonas* et conservation des isolats

Les criquets pèlerins (*Schistocerca gregaria*) ont été capturés dans une région du Sud de Tiaret et transportés au laboratoire où ils ont été aussitôt disséqués dans des conditions d'asepsie. Il s'en est suivi le prélèvement aseptique de 25grammes d'intestin qui sont broyés et homogénéisés par vortex avec 225mL d'eau péptonnée saline (NaCl $8.5g.l^{-1}$; bactopeptone $1g.l^{-1}$) puis laissés en incubation pendant 24h à température ambiante(fig.9). Une série des dilutions adéquates ont été ensemencées sur le milieu King A dont la composition est reportée au tableau x (Annexe1) et qui est le milieu sélectif pour isoler les *sphingomonas* **(King et *al.*, 1954)**. Les isolats de *Sphingomonas* sp sont purifiés et repiqués dans des tubes contenant un milieu KB, dont la composition est reportée au tableau y(Annexe1), additionné de glycérol (25% : V/V), et qui sont incubés à 28°C puis conservés à -20ºC pour une période qui ne dépasse pas les 6 mois.

Figure 9 :L'espèce*Criquet pèlerin* utilisée dans l'isolement des souches *Sphingomonas.*

II.2.3.2. Observation de l'aspect phénotypique des *Sphingomonas*.

Les caractéristiques phénotypiques de souches isolées sont déterminées par observation macroscopique et microscopique des colonies obtenues sur le milieu d'isolement et par la réalisation d'une coloration de Gram (**Larpent et Larpent-Gougaud, 1997**). La coloration de Gram repose sur la différence de composition de la paroi cellulaire entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Ainsi, elle permet de colorer les bactéries et de les distiguer selon leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fushine (Gram -). La lecture au microscope (objectif 100) permet de donner un premier niveau d'identification**.**

II.2.3.3. Méthode d'identification moléculaire des souches isolées

II.2.3.3.1. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait selon la technique de **Provost et *al.* (1997**). Dans un microtube contenant 500 µL d'eau distillée, on introduit d'une suspension bactérienne issue d'une culture jeune de 24h, à laquelle sont ajoutés 150 µL de solution d'extraction(generalement une combinaison de phenol et chloroforme).Le mélange est agité en continu au vortex pendant 2min, puis chauffé a 100°C dans un bain marie a sec pendant 30min, pourêtre

centrifugé ensuite à 10000xg pendant 8min. Les surnageants contenant l'ADN sont alors récupérés dans un microtube stérile et conservés a -20°C (fig10).

II.2.3.3.2. PCR Universelle

Chaque souche est identifiée au niveau du genre ou de l'espèce par séquençage d'un fragment du gène ADNr 6S (ADN ribosomique) après amplification génique (PCR) à l'aide d'un couple d'amorce **91E (**3' TCAAAK*GAATTGACGGGGGC 5') et $16S_2$ (5' GCCCGGGAACGTATTCAC 3') **(Relman et *al*., 1990)**.

Dix µL de la dilution au $1/50^e$ de l'ADN extrait et 15 µL (0.66 pmol/ µL) du melange du couple d'amorce sont introduits dans un tube Ready-to-Go™ PCR contenant la *Taq* polymerase, des dNTP, du Tris HCL pH=9, du KCl .$MgCl_2$.L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Minicycler™ Mj.Research), après une dénaturation initiale à 94°C pendant 10min suivie de 45 cycles de PCR à 94, 55, 72°C pendant 30s, et enfin par une élongation finale à 72°C pendant 10min.

II. 2.3.3.3. Séquençage

Le séquençage dans un seul sens a été effectué en utilisant les amorces 91 E et $16S_2$. Il a été réalisé selon la méthode de **Sanger(1977)** adaptée par le Kit de séquençage DYE terminator (Amershan Biociences, Uppsala, Sweden). Enfin, c'est le séquenceur d'ADN ABI 377 (Applera, Foster City,USA) qui a permis l'analyse automatique des réactions de séquençage.

II.2.4. Evaluation du pouvoir de production d'exopolysaccharides par les souches Isolées

Pour bien comprendre le pouvoir de production des biofilms par les 13 souches isolées il faut, d'abord, quantifier leur pouvoir de production des exopolysaccharides (EPS). Cette quantification des EPS a été réalisée selon la technique décrite par **Dubois et al. (1956)** ce faire, 100 mL du bouillon MRS (De Man Rogosa and Sharpe) ont été inoculés par une jeune culture de chacune des souches à tester à raison de 1% (V/V). Après une incubation de 24h en aérobiose à la température de 37°C, la culture a été centrifugée à 6000 tours/min pendant 20min. Pour un volume de surnageant issu de cette centrifugation, deux volumes d'éthanol à 4°C ont été ajoutés, le tout a été incubé pendant une nuit à 4°C pour précipiter les glucides.

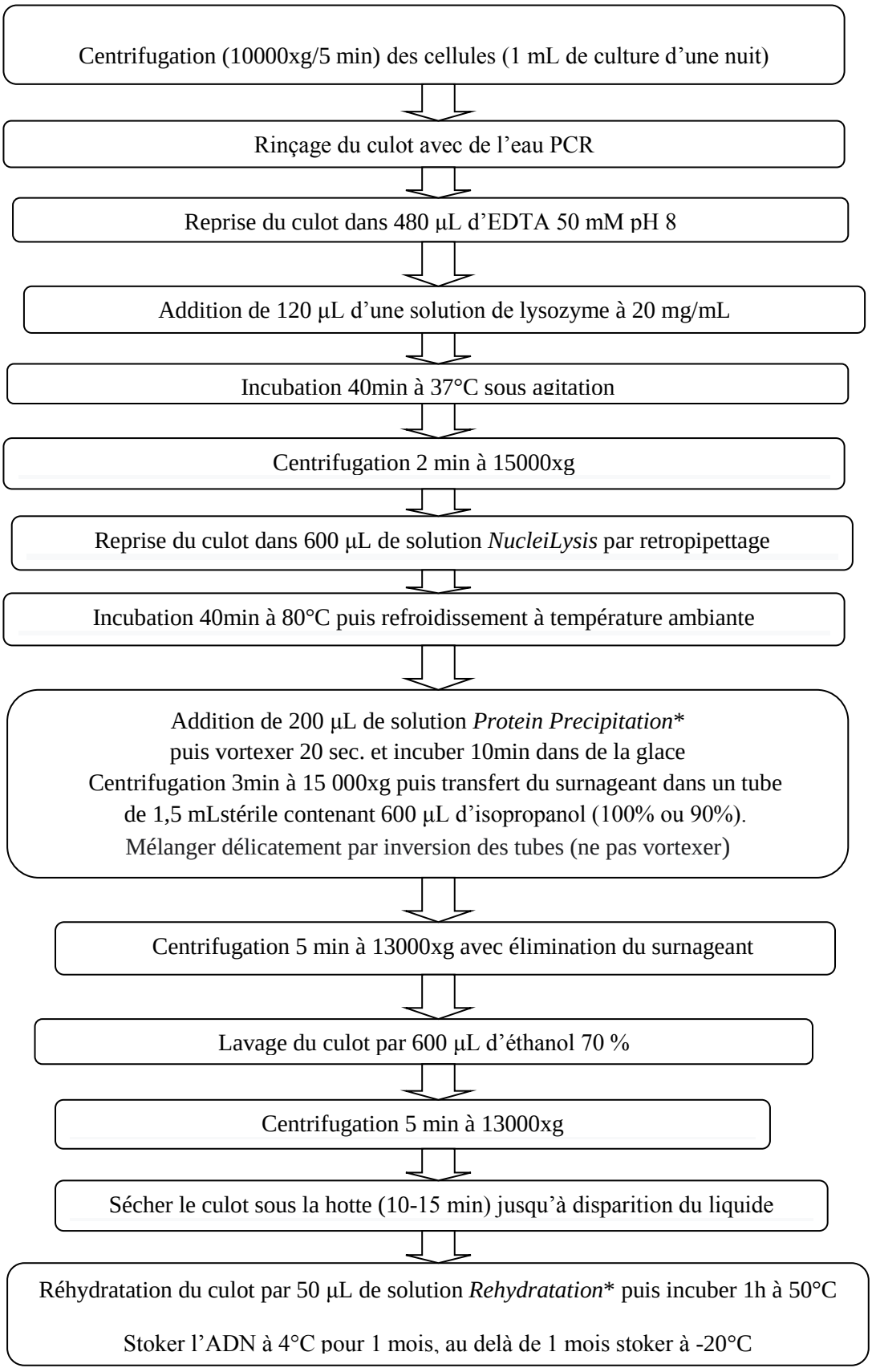


Figure 10: Diagramme d'extraction de l'ADN génomique avec le Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

Les précipités obtenus ont été récupérés par centrifugation à 6000 tours/min pendant 5min et resuspendus dans 2 mL d'eau distillée. Le mélange précipité-eau a été filtré sur un millipore de 0.22 µm de porosité. Ensuite, 40µL de phénol à 80% (V/V) et 2 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés à chaque 800 µL de filtrat suivi d'une agitation au vortex. En parallèle un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon avec de l'eau distillée.

La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 488nm. Sur la base d'une droite étalon établie avec différentes concentrations de glucose, les résultats sont exprimés mg équivalent glucose par litre (**Dubois et *al*., 1956**).

II.2.5. Technique d'élaboration des biofilms

Le protocole suivi pour l'élaboration d'un biofilm par les souches *Sphingomonas* est celui décrit par **Quintilas et *al*. (2009).** Il consiste à placer 1g de zéolite dans des flacons d'erlenmeyer stériles de 250mL. Un volume de 15 mL d'une culture bactérienne jeune de 24ha été ajouté à 150 mL d'eau distillée stérile. Les flacons d'erlenmeyer ont été incubés à 37°C pendant 10 jourssous agitation continue, pour être laissés au repos pendant 4 jours pour permettre l'immobilisation des cellules à la surface du zéolite et optimiser l'adhérence bactérienne.

II.2.6. Méthodes de caractérisation du chitosane et des biofilms

II.2.6.1. Détermination du degré de désacétylation du chitosane

Les degrés d'acétylation (DA) et de désacétylation (DDA) sont des paramètres essentiels pour caractériser le chitosane. Le degré d'acétylation (DA) concerne les groupes N-acétylamine **(Czechowska-Biskup et *al*., 2018)**. Le degré de désacétylation (DDA) montre l'élimination du groupe acétyle de la chaîne et peut être déterminé par analyse FTIR à partir de l'équation (1) et (2). Le degré de désacétylation du chitosane a été calculé en utilisant l'équation commune donnée comme suit **(Domard et Rinaudo, 1983)**. Les valeurs d'absorbance à 1650 cm^{-1} et 3450 cm^{-1} sont les hauteurs absolues des bandes d'absorption des groupes amide et hydroxyle respectivement **(Mohanasrinivasan et *al.*, 2013)**.

$$DA = \frac{A_{1650cm^{-1}}}{A_{3450cm^{-1}}} x \frac{100}{1.33} \qquad \textbf{(1)}$$

$$DDA\% = 100 - DA \qquad \textbf{(2)}$$

II.2.6.2.Méthode à l'infrarouge de Fourier FTIR (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy)

La spectroscopie FTIR (Fourier Transform InfraRed Spectroscopy) (Shimadzu IRPrestige-21) a été utilisée pour comparer et confirmer la conformation chimique du chitosane, nanochitosane et des biofilms élaborés. Les spectres d'échantillons ont été obtenus avec une gamme de fréquence de λ=400-4000 nm**(Bhavani et *al.*, 2016)**.

Pour l'étude de FTIR, la biomasse de biofilm a été centrifugée et séchée (24h à 60°C), ensuite 10mg de l'échantillon biologique (chitosane et biofilm) finement broyé ont été encapsulés dans 100mg de bromure de potassium KBr (RIEDEL Germany) afin de préparer des disques translucides.

II.2.6.3. Technique de Microscopie Electronique à Balayage- Energy Dispersive Spectroscopy (MEB- EDS)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est l'une des techniques les plus polyvalentes, les plus distinguées et les plus populaires dans la recherche ainsi que dans les secteurs industriels. C'est une classe de microscopie électronique qui utilise un faisceau d'électrons à haute énergie pour balayer les échantillons et fournir une image à fort grossissement et résolution. Le faisceau d'électrons du canon à électrons interagit avec les électrons de l'échantillon et produit certains signaux sur la topographie de la surface. Les images MEB sont obtenues en analysant les signaux des électrons secondaires et rétrodiffusés, qui contiennent des informations concernant l'échantillon.

Cette technique fournit des informations abondantes sur les échantillons analysés, y compris, mais sans s'y limiter, la morphologie de la surface, la cristallinité, la composition élémentaire **(Spence , 2013)**. La MEB est largement utilisée depuis des décennies dans l'étude et l'analyse des systèmes de biopolymères pour obtenir des informations concernant la structure, la morphologie, la taille, la forme, les modifications de surface, l'usure, etc… La technique MEB a été d'un grand apport dans l'analyse des biopolymères **(Pang et *al.*, 2013;Shekarforoush et *al.*, 2016; Phinichka et Kaenthong, 2017)**, des nanoparticules de biopolymères **(İlgü et *al.*, 2011; Saari et *al.*, 2017)**. Les images MEB peuvent être utiles pour observer et analyser différentes structures de particules allant des fibres aux microparticules et

aux nanocristaux **(Anžlovar et *al.*, 2018; Fazeli et Renata, 2019)**. Le MEB fournit un moyen efficace d'analyse de ces particules et de leurs surfaces.

La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS) est un accessoire supplémentaire inclus dans la MEB qui fonctionne comme une technique analytique pour déterminer la composition élémentaire ou la caractérisation chimique d'un échantillon **(Girão et *al.*, 2017)**. Dans cette étude nous avons utilisé la MEB-EDS de la marque Philips XL 30 SFEG France pour rendre compte de la morphologie et de la composition élémentaire du chitosane et des biofilms élaborés.

II.2.6.4. Méthode de détermination du potentiel Zêta ou potentiel zéro

Le potentiel Zéta représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entourent quand elle est en suspension ou en solution. Ce potentiel a été déterminé à différentes valeurs de pH allant de 3-9. Pour cela, des suspensions de 10g.L^{-1} d'échantillon de chitosane et de nanochitosane ont été préparées et diluées par de l'eau distillée, ensuite reparties dans des flacons ou le pH initial a été ajusté par l'ajout de NaOH 1N ou HCL (1N) pour avoir une gamme de pH comprises entre 3 et 9. Les suspensions ont été conservées a 4°C et filtrées à 0.45 µm , 2h avant l'analyse (phase de stabilisation). Un volume de 3mL d'échantillon a été introduit dans la cellule de mesure **(Bouauine, 2018).**

Dans cette étude, la cellule de mesure du potentiel zêta utilisée est de marque Zetasizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Royaume-Uni).

II.2.7. Détermination du pouvoir d'adsorption de colorants et de métaux lourds par les biomatériaux préparés

II.2.7.1. Adsorption du bleu de méthylène et du rouge Congo par le chitosane

Les expériences d'adsorption ont été étudiées dans le type d'opération par lots à différentes valeurs initiales de pH, de température et de concentration de colorant (fig.11). Les expériences d'adsorption ont été réalisées à température constante de 25°C en introduisant une quantité pesée avec précision de chitosane (0,25g) dans un volume de 50mL de solutions de deux colorants différents (bleu de méthylène et rouge Congo) de concentration de 100mg.L^{-1} chacune.

Deux séries d'isothermes ont été réalisées pour deux solutions de colorants différents et chaque étude d'isotherme contenait cinq concentrations de colorant allant de 10 à 150mg.L^{-1}. Pour chaque cycle d'expérience, des flacons séparés ont été préparés et utilisés pour évaluer les données expérimentales. À chaque fois, l'adsorbant a été éliminé de la solution par centrifugation à 2600trs/min pendant 4min et les concentrations finales de colorant ont été mesurées dans les solutions en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis (Hach Lange, DR 2800 France) à une longueur d'onde correspondant à une valeur d'absorbance maximale de l'échantillon.

Les capacités d'adsorption de chaque colorant ont été calculées en utilisant l'équation 3

$$q_t = \frac{V(C_0 - C_t)}{m} \qquad \textbf{(3)}$$

Où :

q_t est la masse de colorant adsorbé par unité de poids de l'adsorbant (mg.g^{-1}) au temps t, C_0 et Ct (mg.L^{-1}) sont la concentration initiale et la concentration au temps t (min) du colorant, respectivement; m est la masse d'adsorbant utilisée (g) et V est le volume de solution (L).

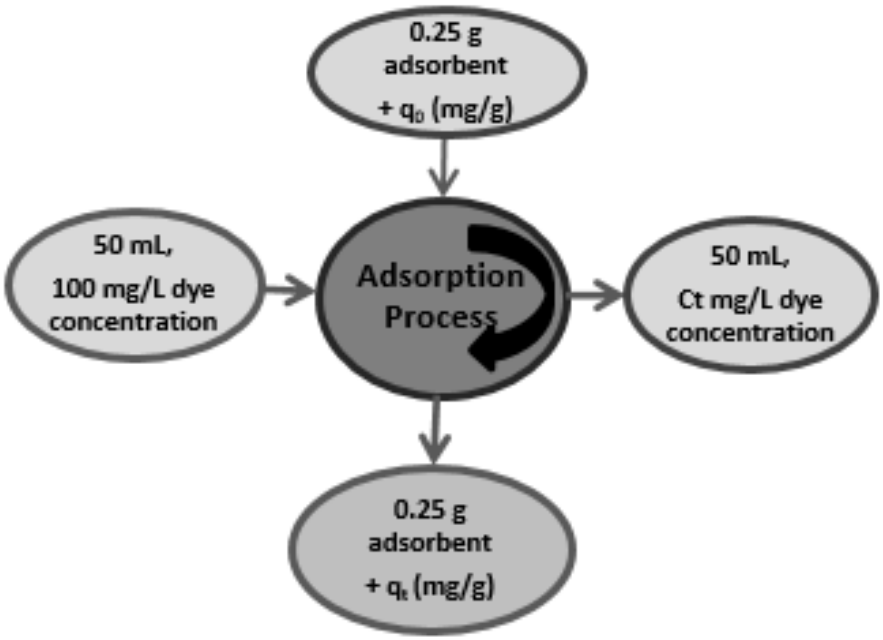


Figure 11 : Schéma de configuration expérimentale d'adsorption par lots utilisé **(Rahali et *al.*, 2020**).

D'autres paramètres (isotherme de Langmuir et de Freundlich, diffucsion intraparticulaire) ont été mesurés expérimentalement.

II.2.7.2. Adsorption de nickel par le chitosane et le nanochitosane

Les expériences d'adsorption ont été menées dans un ensemble de flacons Erlenmeyer de 250mL contenant 0.1g de nanochitosane et 50 mL de solutions d'ions nickel avec différentes concentrations initiales (50, 70, 100 , 200 , 300 et 400mg/L). Les valeurs de pH utilisées sont 2, 3, 5, 7 et 9. La cinétique d'adsorption du nickel en fonction de différentes températures (20, 35 et 50°C) a été suivie. Les expériences d'adsorption de nickel ont duré 360 min. Les flacons ont été placés dans un agitateur rotatif à 200 trs/min. Les échantillons ont été filtrés et la concentration résiduelle d'ions nickel a été analysée par spectrophotométrie à plasma à couplage inductif (ICP) (PerkinEimer Optima 7000 DV Germany**).** La capacité d'adsorption de nickel a été calculée selon l'équation 3.

II.2.7.3. Adsorption de Nickel et de cobalt par les biofilms des souches isolées

Des solutions aqueuses mères à 1000 mg/l (P/V) de chlorure de nickel hydraté ($NiCl_2$, $6H_2O$) et de chlorure de cobalt (Cl_2Co, $6H_2O$) ont été préparées.

La zéolite (notée NaY avec le rapport Si/Al = 2.83), utilisée comme le support d'une surface spécifique de 900m^2/g, a été obtenue auprès de Zeolyst (Société Minière Rota dans la ville Gördes / Manisa Turquie). La zeolite a été sélectionnée en raison de sa capacité a immobiliser les microorganismes **(Milán et *al.*, 2001)**.Toute la verrerie utilisée a été lavée dans l'acide nitrique à 10% (V/V) puis rincée avec de l'eau distillée pour éliminer toute interférence possible avec d'autres minéraux.

Les expériences d'adsorption par lots ont été menées dans des Erlenmeyers de 250mL en utilisant 1g de zeolite NaY avec 15mL de milieu de culture pour les bacilles *Sphingomonas* et 150mL des différentes solutions de métaux lourds (20, 50, 70, 100mg/L) dont les pH ont été mesurés. Les Erlenmeyers ont été maintenus à 37°C, sous agitation modérée pour favoriser le contact entre le biofilms et les solutions métalliques, pendant 10jours (temps nécessaire pour atteindre l'équilibre). Des échantillons de 1mL ont été prélevés, centrifugés

et les concentrations d'ions métalliques pendant les expériences ont été mesurées par ICP **(Quintelas et *al*., 2009)**.

II.2.8. Cinétique d'adsorption

La cinétique d'adsorption définit les voies de réaction, les vitesses et le mécanisme du processus jusqu'à l'équilibre. Les différents modèles cinétiques étudiés sont les suivants:

II.2.8.1. Pseudo-premier ordre:

Ce modèle décrit la cinétique d'adsorption d'une espèce dans un adsorbant par l'équation différentielle ordinaire du premier ordre qui donne par intégration l'équation suivante (4) **(Lagergren , 1898; Yuh-Shan , 2004)** :

$$log(q_e - q_t) = log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} t \textbf{(4)}$$

Où:

qt et qe ($mg.g^{-1}$) est la quantité d'adsorption de colorant par unité d'adsorbant au temps t et à l'équilibre respectivement, k_1 est la constante de vitesse de pseudo-premier ordre (min^{-1}) calculée à partir du graphique de log(Qe-Qt) dans un instant t.

II.2.8.2.Pseudo-second ordre:

Dans ce modèle, la liaison des polluants à la surface de l'adsorbant est due aux interactions physico-chimiques entre l'adsorbant et l'adsorbat, conduit à un processus de chimisorption **(Bulut et *al*., 2008)**. La forme linéaire de ce modèle est donnée par l'équation (5) (**Ho et McKay , 1999)**.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2' q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad \textbf{(5)}$$

Où:

k'_2 ($g.mg^{-1}.min^{-1}$) est la constante de vitesse pour le modèle de pseudo-second ordre, utilisée pour calculer le taux d'adsorption initial (*h*) ($mg.g^{-1}.min^{-1}$) par l'équation (6) :

$$h = k_2' q_e^2 \quad \textbf{(6)}$$

Les valeurs de h , k'_2 et qe sont calculées à partir du graphe de t/q_t dans un moment t.

Le modèle de diffusion intra-particules a été utilisé pour interpréter le processus d'adsorptiondu bleu de méthylène et du rouge Congo par le chitosane. Ce modèle peut être représenté par l'équation (7) **(Weber et Morris, 1963)**.

$$q_t = k_i t^{1/2} \qquad \textbf{(7)}$$

Où k_i est la constante de vitesse intra-particulaire (mg. g^{-1}. $min^{1/2}$).

L'isotherme d'adsorption exprime la différence de concentration de soluté aux phases liquide et solide à l'équilibre. Dans cette étude, le processus d'adsorption a été étudié par les modèles d'isothermes de Langmuir et Freundlich. Dans le modèle de Langmuir (équation 8), seule l'adsorption homogène a lieu sur la surface solide et un endroit ne peut avoir été occupé que par un soluté et aucune adsorption ne peut plus se produire à cette surface **(Langmuir , 1918)**.

$$\frac{C_e}{q_e} = \left(\frac{1}{Q_m b}\right) + \left(\frac{1}{Q_m b}\right) C_e \qquad \textbf{(8)}$$

Lorsque C_e ($mg.L^{-1}$) est la concentration des polluants à l'équilibre, Q_m est la capacité d'adsorption la plus élevée ($mg.g^{-1}$) et b ($L.mg^{-1}$) est la constante du modèle d'isotherme de Langmuir.

Un paramètre de séparation sans dimension, R_L peut également être calculé à partir de l'équation de Langmuir **(Freundlich, 1906)**. Les valeurs R_L calculées montrent la description du type d'adsorption selon l'équation 9, par exemple, linéaire (R_L= 1), favorable ($0<R_L<1$), ou irréversible (R_L= 0) **(Wu et *al.*, 1999; Babu et Gupta, 2007)**.

$$R_L = \frac{1}{1+bC_0} \qquad \textbf{(9)}$$

L'isotherme empirique de Freundlich (équation 10) peut être utilisé pour décrire l'adsorption non parfaite et multicouche sur des surfaces hétérogènes **(Hall et *al.*, 1966)**. La

constante *n* est liée à l'intensité d'adsorption tandis que l'autre constante K_F est liée à la capacité d'adsorption ($mg.g^{-1}$).

$$log\ q_e = log\ K_F + n\ log\ C_e \qquad \textbf{(10)}$$

K_F en ($mg.g^{-1}$).($L.mg^{-1}$) $^{1/n}$ et *n* sont des constantes du modèle de l'isotherme de Freundlich qui se rapportent respectivement à la capacité et à l'intensité d'adsorption (**Desta, 2013; Campbell et Davies, 1995)**. Le rapport en puissance (1/*n*) est fonction de la force d'adsorption et mesure l'hétérogénéité de surface **(Foo et Hameed, 2010; Dada et *al*., 2012)**. Si *n*=1 alors la partition entre la phase liquide et la phase solide est indépendante de la concentration, tandis que l'adsorption est linéaire **(Coles et Yong, 2006)**, si la valeur du rapport (1/*n*)>1, cela indique une adsorption coopérative; cependant, si (1/*n*)<1 cela indique une adsorption normale **(Fan et *al*., 2013)**.

Chapitre III

Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Pouvoir adsorbant du chitosane vis-à-vis du bleu de méthylène et du rouge Congo

III.1.1. Caractérisation physico-chimique du chitosane

III.1.1.1. Résultat d'analyse par la FTIR

La spectroscopie FTIR du chitosane (fig.12) a montré que la vibration d'élongation située à 3429cm^{-1} marque l'apparition du groupe amine N-H. En fait, les bandes correspondant à la vibration de valence symétrique du groupe CH_3 et à celle de l'allongement C-H étaient respectivement de 2924 cm^{-1} et 2893 cm^{-1}. Il y avait également une vibration C-C de l'anneau aromatique à 1577cm^{-1} et une vibration N=N à 1485cm^{-1}. De plus, la vibration d'allongement C-N est apparue à 1379cm^{-1} et 1179cm^{-1}. Il y avait aussi une bande à 1103cm^{-1} qui correspond à la vibration S=O. La vibration de déformation dans le plan C-H est à 1026cm^{-1}, 811.59 cm^{-1} et 689.34 cm-1. Enfin, une bande à une vibration C-S est apparue à 582.13 et 536.05 cm^{-1}.

Cependant, après l'adsorption du bleu de méthylène et du rouge Congo sur le chitosane, on observe, d'une part, l'apparition de deux pics autour de 900 cm^{-1} et 554 cm^{-1} correspondant aux anneaux aromatiques C=C des colorants **(Boucherdoud et *al.*, 2019);** et d'autre part, une diminution de l'intensité des pics 1379cm^{-1} et 1577cm^{-1} qui correspond à C-N, et du cycle aromatique, respectivement, en raison de l'interaction électrostatique entre ces groupes et l'atome de soufre du bleu de méthylène et le groupe sulfoné du Rouge Congo **(Sakkayawong et *al.*, 2005).** Un autre changement évident est observé au niveau de la fréquence 3429cm^{-1} ; ce qui indique la participation des groupes amine dans le processus d'adsorption **(Huang et *al.*, 2011)**. Ces changements, après adsorption de colorants, ont prouvé qu'il s'est produit un contact chimique entre le chitosane et les molécules de colorant, comme les principaux groupes fonctionnels engagés dans le processus d'adsorption des deux molécules de colorant sur le chitosane étaient les groupes amine **(Jawad et *al.*, 2020; Malek et *al.*, 2020)**.

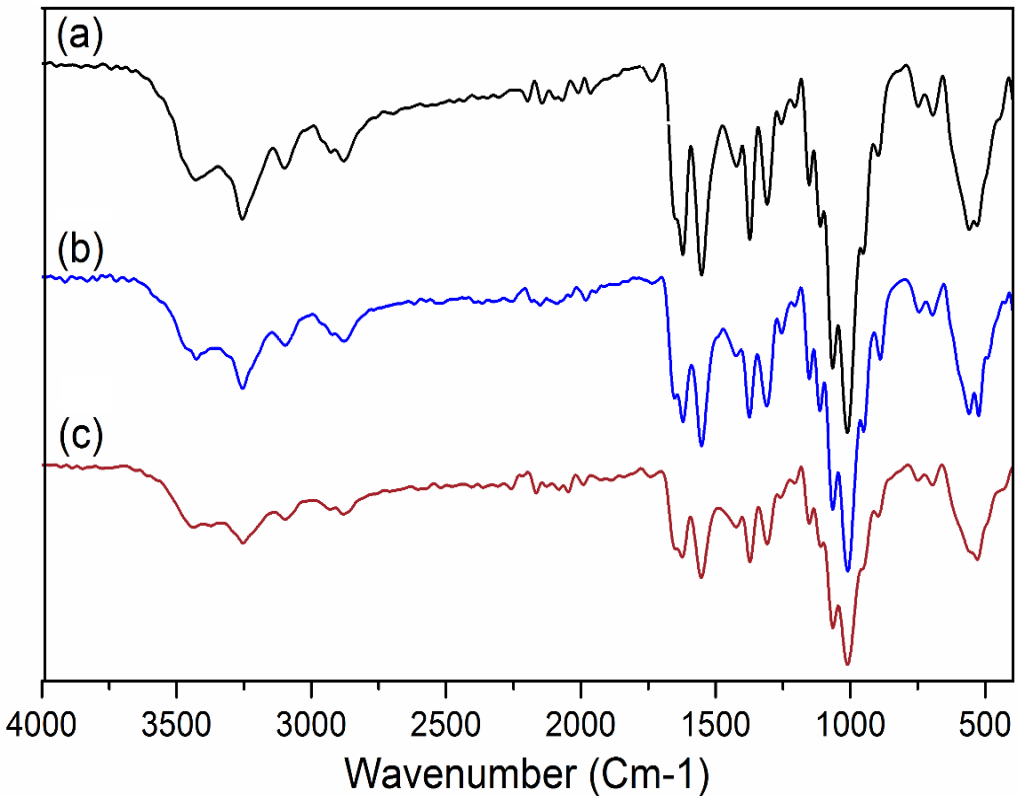


Figure 12 : Spectroscopie FTIR de chitosane. **(a)** avant adsorption, **(b)** après l'adsorption de bleu de méthylène (BM) et **(c)** de rouge Congo (RC).

III.1.1.2. Nature du potentiel zêta du chitosane

Le potentiel zêta ou pH_{pz} (pH auquel la charge électrique est nulle à la surface de l'adsorbant) est un paramètre très important expliquant le processus d'adsorption en termes d'attractions électrostatiques entre la surface chargée de l'adsorbant et les polluants. Le pH_{pz} du chitosane ou pH_{pzc} est mesuré dans une gamme de pH entre 3 et 9 correspondant à des valeurs potentielles comprises entre 10,6 mV et -9,88 mV. Le résultat du pH_{pzc} à différentes valeurs de pH est reporté sur la figure 13. Le pH_{pzc} diminue presque linéairement avec l'augmentation du pH, et sa valeur optimale obtenue à un pHde 6,5. Il est important d'indiquer qu'à un pH> 6,5, la surface du chitosane est chargée négativement ; alors qu'à pH <6,5, la surface du chitosanedéveloppe une charge positive. La charge positive du chitosane est obtenue par protonation du groupement amine sous forme NH^{3+} après sa solubilisation dans l'acide acétique.

En milieu acide, le chitosane (Chit-NH_2) peut agir comme une base faible et réagit avec les protons H^+ résultant de la dissociation de l'acide acétique pour produire le chitosane sous

forme protonée (Chit-NH3 +) selon la réaction stable suivante (équation 11) **(Rinaudo et *al.*, 1999)**:

$$\text{Chit-NH}_2 + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Chit-NH}_3^+ \qquad (11)$$

Lorsque le pH augmente, il y a une diminution du potentiel zêta du chitosane en raison de la neutralisation des charges du chitosane par un excès de NaOH. Des groupes hydroxyle forts sont produits en présence de NaOH et peuvent interagir avec le proton H^+ du groupe amine sur le chitosane. Par conséquent, à des pH inférieurs à 6.5, le proton H^+ du chitosane est protégé. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Yan-Rung et *al.* (2015)**.

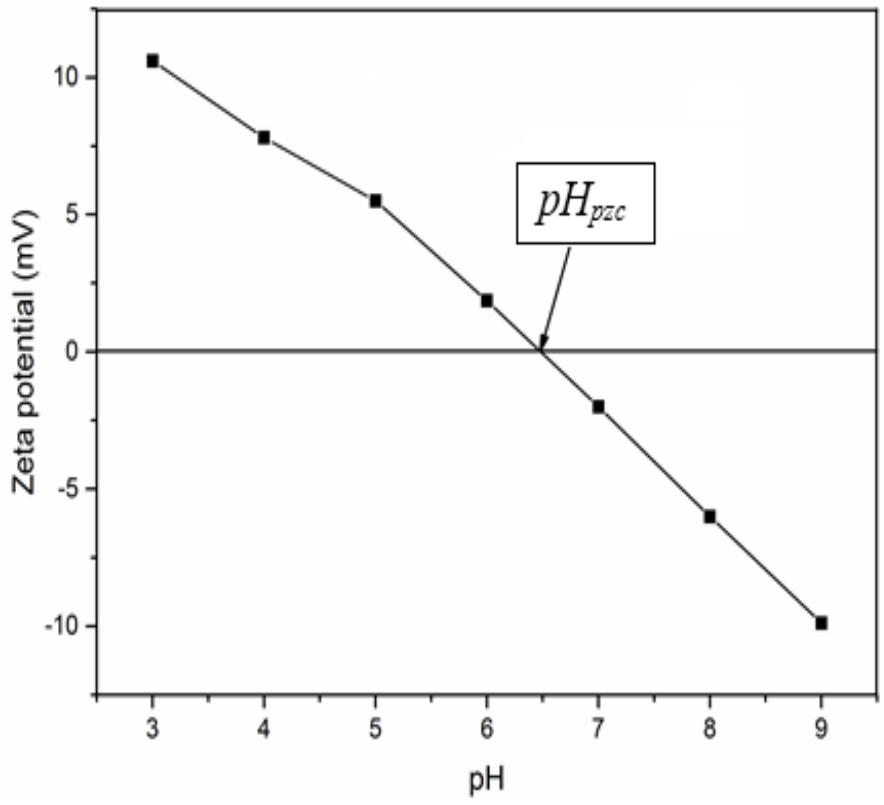


Figure 13: Potentiel zêta du chitosane en fonction du pH.

III.1.1.3. Résultat d'analyse par MEB-EDS

La morphologie du chitosane a été explorée par microscopie électronique à balayage (MEB). La photographie MEB du chitosane de carapaces de crevettes pêchées à Mostaganem à différents grossissements est reportée sur la figure 14 qui montre qu'il se présente sous forme de couches de flocons et que certaines zones étaient poreuses (grossissement x1000). Ces résultats sont en accord avecceux publiés par **Kucukgulmez et *al.* (2006)**.

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB) couplée à l'Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) est une technique courante d'identification des éléments chimiques distribués à la surface du chitosane. La composition du chitosane a été déterminée par EDS (fig.15). La microanalyse de l'EDS a révélé la présence de 60% de carbone (C), 38% d'oxygène (O) et 0.5% d'aluminium (Al). L'existence d'aluminium avec un petit pourcentage est lié à la métallisation, et non pas de l'azote lié aux paramètres des vêtements.

III.1.1.4. Degré de désacétylation du chitosane

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique rapide d'évaluation qualitative du degré d'acétylation (DA) en calculant les rapports d'absorbance d'une bande caractéristique d'un groupe acétyle sur une bande commune aux unités acétylées et désacétylées **(Brugnerotto et *al.*, 2001)**. Selon l'équation 2 citée en méthodologie, le DA est de 40.73%.

Le degré de désacétylation (DDA) est déterminé par l'application de la loi traduite par l'équation 2 qui indique une valeur de 59.25%. Le DDA est un paramètre important affectant la solubilité, la réactivité chimique et la biodégradabilité. Selon la source et la procédure de préparation, le DDA peut varier de 30% à 95% **(Ekkalak et Saipin, 2014).**

Les resultats obtenues sont en accords a ceux trouvés par **Mohamed Rabiul et al., (2014).**

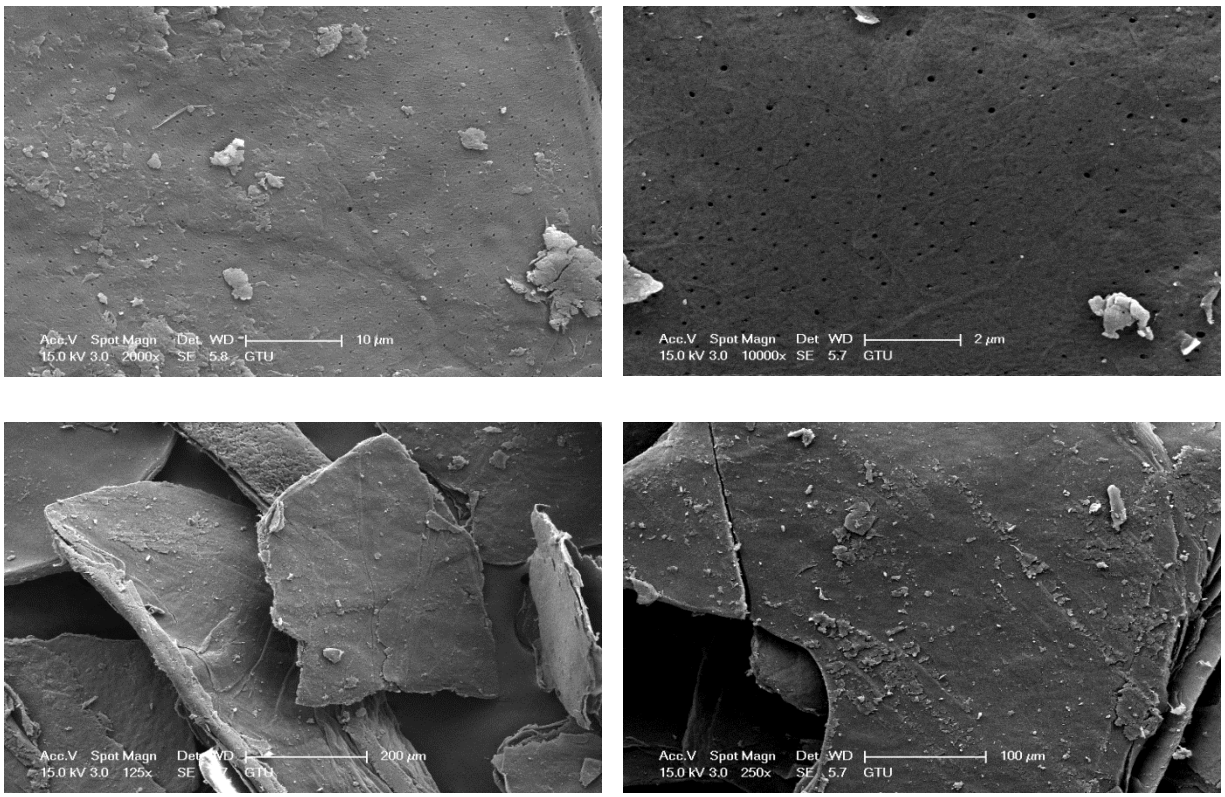
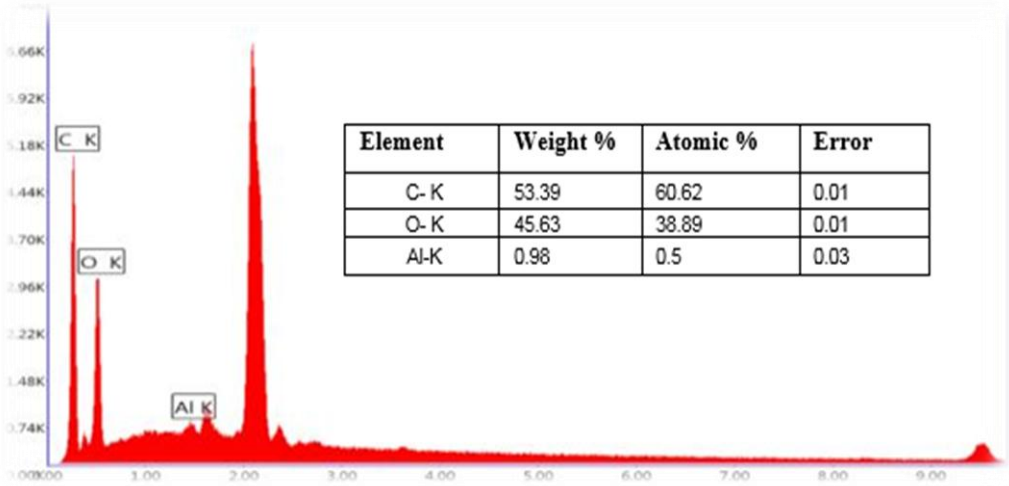


Figure14: Micrographe MEB de chitosane de carapace de crevette pêchée à Mostagaem avec différents grossissement (2, 10, 100, 200µm).



Element	Weight %	Atomic %	Error
C- K	53.39	60.62	0.01
O- K	45.63	38.89	0.01
Al-K	0.98	0.5	0.03

Figure15: Les spectres EDS et les éléments trouvés à la surface du chitosane.

III.1.2. Facteurs d'influence du pouvoir adsorbant du chitosane

III.1.2.1. Facteur temps

Il est nécessaire de déterminer un temps de contact idéal pour atteindre l'équilibre (c'est-à-dire que la quantité de colorant adsorbée ainsi que la concentration restent inchangées ou stables). Le temps d'équilibre est le moment où tous les sites du polysaccharide (chitosane) sont saturés et où il n'y a aucune possibilité de fixation de bleu de méthylène (MB) et de rouge Congo (CR) sur le matériau adsorbant. Comme le montre la figure 16, la quantité adsorbée augmente avec le temps une fois que tous les sites sont remplis. Suite à la progression du processus d'adsorption, le nombre de sites actifs disponibles pour le processus d'adsorption a diminué, conduisant à une augmentation plus lente du taux d'adsorption. L'établissement d'un plateau indique l'équilibre dynamique entre l'adsorption et la désorption des colorants **(Wong et al.,2018).**

Au cours des 30 premières minutes, on a constaté que les taux d'élimination maximum des deux colorants par l'adsorption étaient égaux à plus de 90% avec une quantité d'élimination de 43 $mg.g^{-1}$. **Jumadi et al. (2019)** ont trouvés que l'adsorption du bleu methylene et Rouge congo par le chitosane était maximale lors des 30 premières minutes.

III.1.2.2. Facteur pH

Le pH de la solution est l'un des autres facteurs essentiels qui influent sur le processus d'élimination. La plage de pH de 3 à 10 a été choisie pour étudier l'effet du pH sur l'adsorption des deux colorants MB et CR sur le chitosane. Le bleu de méthylène est un colorant cationique (chargé positivement), l'élimination par adsorption est donc plus favorable en pH acide en raison du phénomène de contact électrostatique entre le colorant et le chitosane. Cependant, les taux d'élimination du colorant n'ont pas été affectés par les changements de pH car il y a toujours plus de sites actifs disponibles pour le colorant au niveau de l'adsorbant dans les conditions expérimentales adoptées. Les résultats reportés sur la figure 17 confirment ce phénomène.

Pour le colorant RC, à un pH de la solution RC supérieur au potentiel zêta du chitosane pHpzc, le taux d'élimination du RC diminue de 90 à 83% en raison de l'expulsion du chitosane (les groupes chargés positivement. En outre, il y a également une concurrence entre les groupes hydroxyles (OH^-) de la solution et les anions RC pour les sites d'adsorption chargés positivement du chitosane.

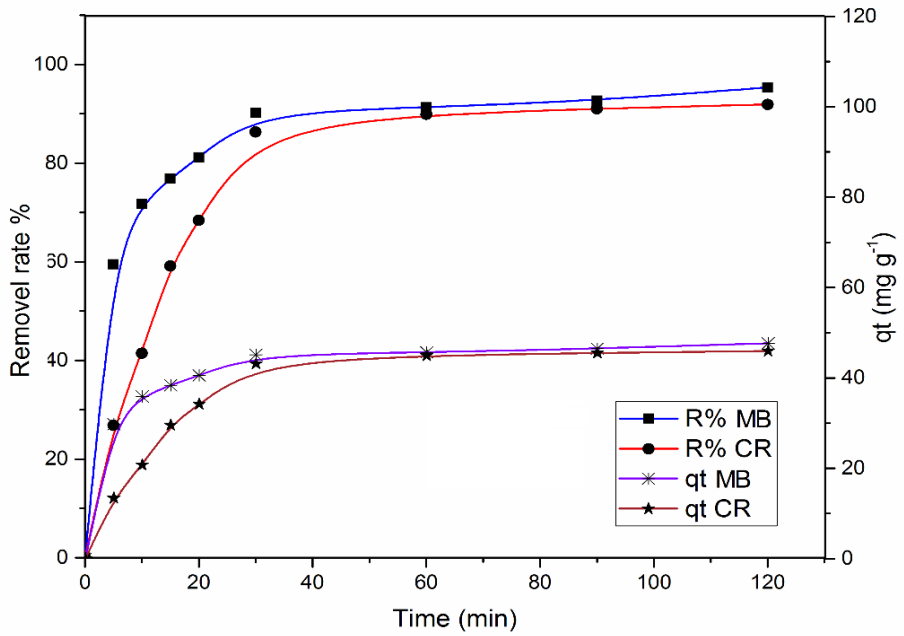


Figure16 : Effet du temps de contact sur l'adsorption du bleu de méthylène (MB) et du rouge Congo (CR) par l'utilisation de chitosane. (m=0.25g, C_0=100mg.L^{-1}, T=20°C, V=50mL, pH=6.7 pour MB et 7.1 pour RC.

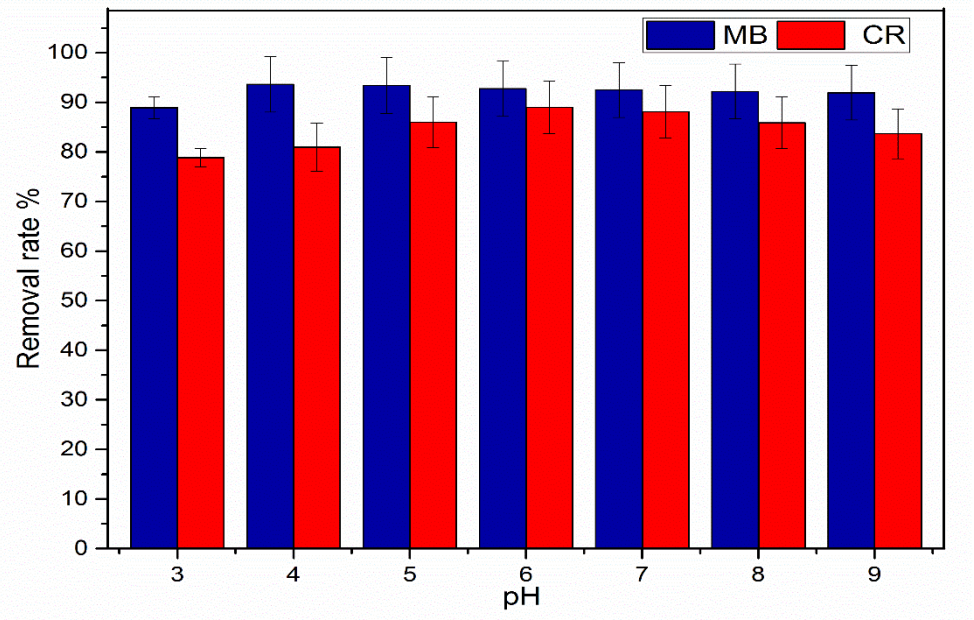


Figure17: Effet du pH sur l'adsorption de bleu de méthylène (MB) et du rouge Congo (CR) par le chitosane. (C_0=100 mg.L^{-1}, m=0.25g, t=120min, T=20°C et V= 50mL).

Pour un pH faible (milieu fortement acide), le RC est légèrement soluble **(Bulut et Karaer, 2014)**; ce qui diminue le taux d'élimination jusqu'à 79%. En revanche, lorsque le pH est proche de pHpzc, le CR est très soluble et le chitosane est toujours protoné donc un bon taux d'élimination de 90% à pH= 6 est assuré. L'élimination réduite du deuxième colorant, le bleu de méthylèe, en milieu fortement acide (pH=3) reflète la présence d'un excès d'ions H^+ qui entrent en compétition avec les charges positives du MB **(Crini, 2008)**. Il convient de remarquer que, globalement, lorsque le pH est supérieur à 4, le taux d'élimination des colorants par le chitosane se situe entre 92 et 93 %.

III.1.2.3. Facteur dose d'adsorbant

La dose de l'adsorbant peut également affecter l'efficacité du processus d'adsorption. L'effet de la quantité d'adsorbant (chitosane) a été examiné en utilisant 0.05 à 0.35 g de masse d'adsorbant et les résultats sont illustrés par la figure 18. Ces résultats montrent que le taux d'élimination du bleu de méthylène augmente très peu avec la masse d'adsorbant, alors que le taux d'élimination du rouge Congo (CR) augmente avec la quantité d'adsorbant.

En d'autres termes, le taux d'élimination du CR augmente de 38% à 90% , et si on calcule la quantité éliminée Q_e correspondante aux pourcentages 38 et 90% on trouve une diminution de 38mg.g^{-1} à 13mg.g^{-1},car les sites libres sur le chitosane augmentent avec l'augmentation de la quantité d'adsorbant utilisée. Dès qu'ils les sites libres du chitosane dépassent le nombre souhaité, le rendement diminue automatiquement. Ce comportement eut être décrit par l'augmentation du nombre de sites d'adsorption disponibles et de la surface spécifique de l'adsorbant, ce qui entraîne une augmentation de l'efficacité de l'élimination des colorants. Cesrésultats concordent avec les autres travaux trouvés dans la littérature **(Zhu et *al*., 2012; Singh et *al*., 2017)**.

III.1.2.4. Facteur charge initiale en colorants

L'effet des concentrations initiales de colorant sur l'élimination des colorants MB et CR (fig.19) a été obtenu en faisant tester différentes concentrations à température ambiante. Les deux taux d'élimination des colorants ont tendance à diminuer avec l'augmentation des concentrations initiales. Ceci est peut-être dû à l'espace insuffisant des sites d'adsorption sur la surface de l'adsorbant.

Cependant, on observe une relation de proportionnalité entre la quantité adsorbée et un comportement contradictoire entre le taux d'élimination du colorant et la concentration initiale. Ces résultats peuvent être expliqués par la théorie de la collision qui affirme que la présence de plus de substances dans un système augmente la probabilité que les molécules entrent en collision et accélèrent la vitesse de réaction.

Ainsi, l'augmentation de la concentration du colorant entraîne une augmentation du nombre d'ions du colorant dans une solution, impliquant, par ce fait, une meilleure adsorption. On peut également dire que l'augmentation de la concentration initiale de colorant entraîne une augmentation du grade de masse entre la solution et l'adsorbant **(Wang Let Wang, 2007)**.

III.1.3. Allure des isothermes d'adsorption

L'étude des isothermes est fondamentale pour la description du comportement interactif entre le chitosane et la solution de colorant. Les données expérimentales d'équilibre ont été analysées par deux types d'isothermes d'adsorption: Langmuir et Freundlich. Les courbes d'adsorption à l'équilibre de l'élimination du colorant sont représentées sur la figure 20 et, comme on peut le voir sur cette figure, la courbe aiguë des isothermes augmente soudainement aux premiers stades en raison de l'existence de sites facilement accessibles.

Cependant, la courbure des tracés continuait de s'élever à la fin des conditions de procédé étudiées, ce qui montre qu'il existe encore des sites actifs disponibles pourl'adsorption du colorant. Les paramètres isothermes et les coefficients de corrélation R^2 calculés sont indiqués dans le tableau 11.

Le résultat indique que les deux modèles d'isothermes d'adsorption étaient bien représentés par deux modèles d'isothermes : ceux de Langmuir (fig. 21) et Freundlich (fig. 22). Les valeurs des paramètres de séparation de R_L pour les procédés d'adsorption de colorant ont été calculées à l'aide de l'équation 8 et ont été trouvées dans la plage de 0.03-0.538; ce qui indique que les procédés d'élimination du colorant sont favorables.

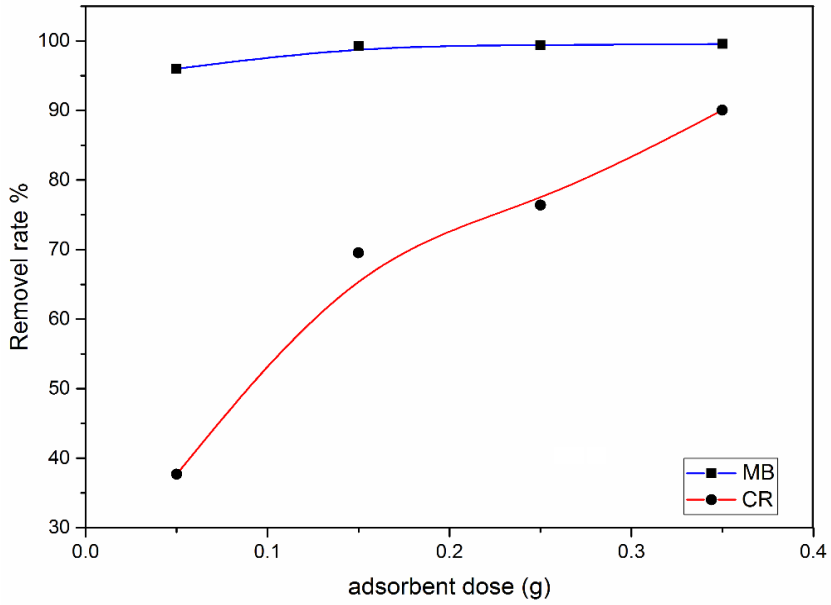


Figure 18 Effet de la masse d'adsorbant sur l'adsorption de méthylène bleu et rouge congo (C_0 =100 mg.L^{-1}, t=120min, T=20°C, V=50mL, pH 6.7 pour MB et 7.1 pour CR).

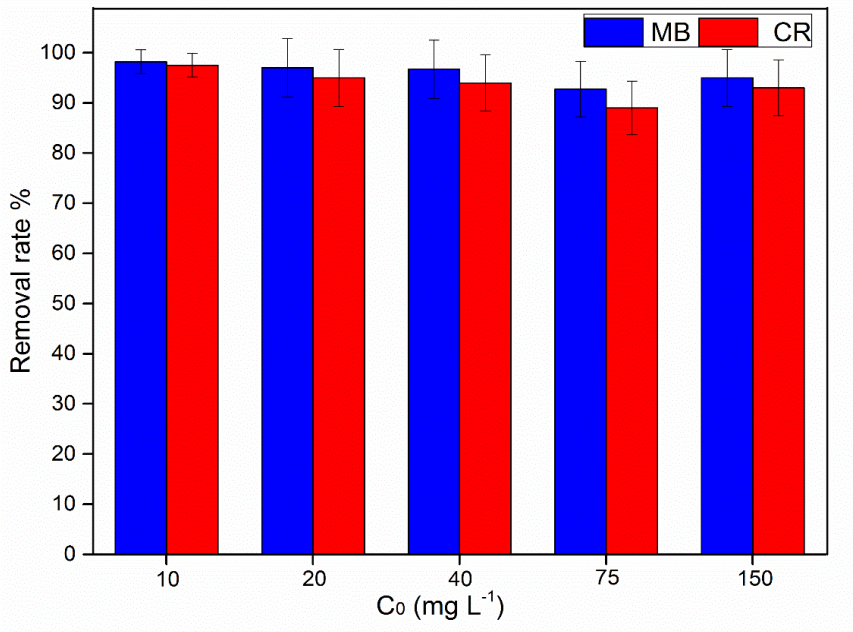


Figure19: Effet de la concentration initiale des colorants sur l'adsorption du bleu de méthylène (MB) et du rouge Congo (RC) par le chitosane (pH =4, m = 0.25 g, t = 120 min, T = 20 °C et V = 50 mL).

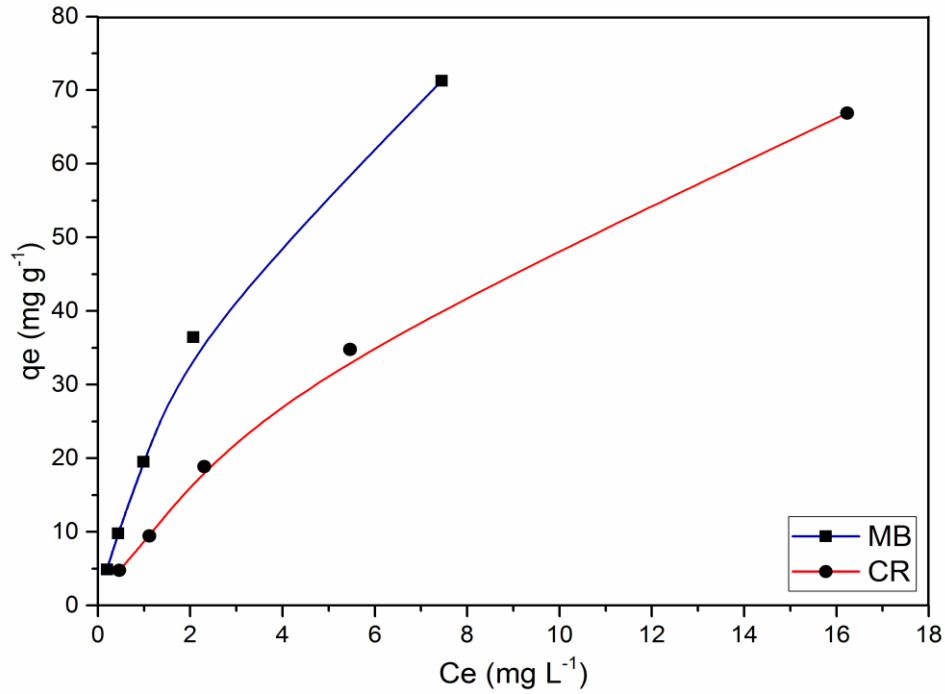


Figure20 : Représentation graphique de l'équilibre d'adsorption pour les colorants, le bleu de méthylène (BM) et le rouge Congo (RC) (m= 0,25g, T=20C°, V=50m pH du sol 6,7 pour MB et 7,1 pour CR).

Tableau 11: Les constantes isothermes et les coefficients de corrélation des modèles isothermes utilisés.

Colorants	Isotherme d'adsorption de Langluir			Isotherme d'adsorption de Freundlich			Paramètre de séparation
	Q_m ($mg.g^{-1}$)	b ($L.mg^{-1}$)	R^2	K_F $(mg.g^{-1})(L.mg^{-1})^{1/n}$	n	R^2	R_L
MB	116.3	0.2139	0.997	18.16	0.743	0.987	0.072-0.538
CR	113.6	0.0858	0.986	9.014	0.762	0.993	0.030-0.318

La forme linéarisée des isothermes de Langmuir et de Freundlich pour les deux colorants MB et CR s'avère linéaire avec des coefficients de corrélation $R^2 > 0.98$ extrêmement élevés, comme le montre le tableau 11.

L'analyse des résultats de la modélisation a montré que l'adsorption du MB issue du modèle de Langmuir avait donné le meilleur ajustement des données expérimentales. En effet l'adsorption du CR du modèle est assuré par le modele de Freundlich. La capacité d'adsorption maximale du MB et du CR obtenue à partir du modèle de Langmuir est de 116.3 $mg.g^{-1}$ et 113.6 $mg.g^{-1}$, respectivement; ce qui indique que le chitosane a une bonne efficacité d'élimination pour ces deux polluants. Une brève étude comparative de la capacité d'adsorption des différents adsorbants pour l'élimination du MB et du CR est présentée dans le tableau 12.

III.1.4. Particularités de la cinétique d'adsorption

Les données expérimentales ont été analysées à l'aide de trois modèles cinétiques d'adsorption, par exemple des modèles cinétiques de pseudo premier ordre et de pseudo deuxième ordre et des modèles de diffusion intra-particulaire utilisant les équations 4 et 6. Le tableau 13 présente les constantes cinétiques et les coefficients de corrélation calculés à partir des données expérimentales.

III.1.4.1. Selon le modèle pseudo premier et second ordre

Les résultats obtenus traduisent de bons coefficients de corrélation pour le modèle cinétique du pseudo deuxième ordre indiquant que le processus d'absorption du colorant suit le modèle cinétique du taux du pseudo deuxième ordre. Certaines études sur le même sujet ont rapporté des résultats analogues concernant l'élimination des colorants par le chitosane et le chitosane modifié **(Lipatova et *al.*, 2008; Chen et *al.*, 2019)**.

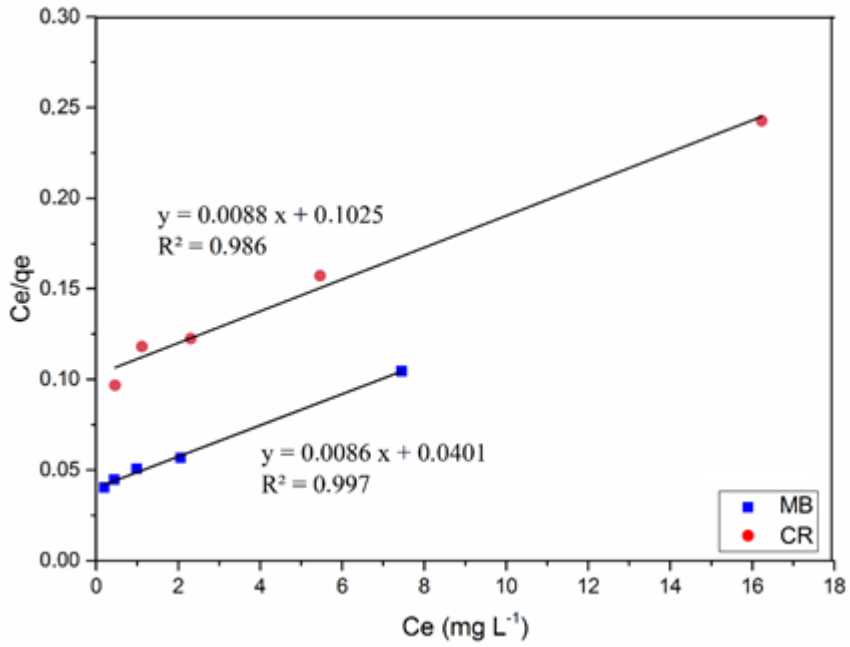


Figure 21: Isotherme d'adsorption de Langmuir pour les colorants BM et RC(*m*=0.25 g, *T*=20°C ,*V*=50mL).

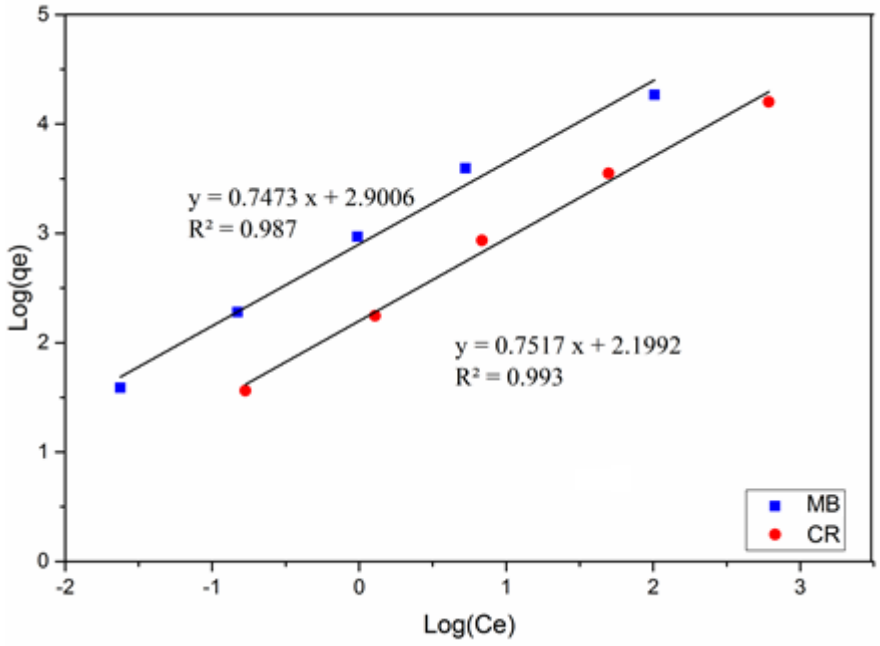


Figure 22: Isotherme d'adsorption de freundlich pour les colorants BM et RC (*m*=0.25g, *T* =20 °C et *V*=50mL).

Tableau 12: Comparaison des capacités d'adsorption maximales (Qm) des colorants rouge Congo (CR) et bleu de méthylène (MB) sur différents adsorbants

Adsorbants	Polluants	Q_m (mg g^{-1})	Références
Chitosan nanocomposite beads	Methylene blue	36.25	Rahmi I. et Irfan M., 2019
Alginate-activated carbon composite	/	40.70	Boucherdoud A. et al., 2019
Crosslinked chitosan / bentonite composite	/	142.86	Crini G., 2008
Biomass-based activated carbon by $FeCl_3$ activation	/	259.20	Theydan S.K. et Ahmed M.J., 2012
Chitosan	/	116.30	This work
Chitosan coated magnetic iron oxide	Congo red	56.66	Zhu H. et *al.*, 2012
Chitosan/montmorillonite nanocomposite	/	53.42	Wang L. et Wang A., 2007
Carbon nanofiber @graphite	/	733.20	Shen Y. et al., 2016
Chitosan	/	113.60	This work

Tableau 13: Les constantes cinétiques et les coefficients de corrélation calculés.

	Pseudo-first order			**Pseudo-second order**			
	k_1 (min^{-1})	q_e (*m*g.g^{-1})	R^2	k_2X10^4 (g.mg^{-1}.min^{-1})	q_e (*m*g.g^{-1})	H (mg.g^{-1}.min^{-1})	R^2
MB	0.096	32.063	0.875	3.960	50.251	1.000	0.997
CR	0.039	20.568	0.939	3.880	50.761	1.000	0.989

III.1.4.2. Selon la diffusion intra particulaire

Le comportement de diffusion de l'expérience d'adsorption solide-liquide a été exploré par un modèle de diffusion intra-particulaire. Comme le montre la figure 23, deux portions linéaires séparées de graphiques intra-particulaires montrent que deux mécanismes de diffusion différents ont lieu dans le processus d'élimination complète.

Le premier est le transfert de masse externe sur la surface de l'adsorbant, tandis que les étapes suivantes, linéaires, sont le ralentissement et l'adsorption finale (tableau 14). On peut donc affirmer sans risque que les formes ioniques des colorants ont d'abord été adsorbées par la surface externe de l'adsorbant, puis, après avoir atteint la saturation, elles sont passés dans les pores du chitosane et ont été adsorbées par les surfaces internes. Une multilinéarité similaire a été signalée pour l'élimination de colorants textiles sur le matériau adsorbant fibreux en chitosane perméable **(Lipatova et *al.*, 2008)** et le nanonchitosane **(Darvishi Cheshmeh Soltani et *al*., 2013).**

III.2. Pouvoir d'adsorption du nanochitosanvis-à-vis du nickel

III.2.1. Caractérisation physico-chimique du nanochitosane

III.2.1.1. Résultat d'analyse comparée par la FTIR avant et après adsorption

La figure 24 représente le spectre FTIR du nanochitosane préparé à partir du chitosane en utilisant la méthode de gélification ionotropique avec du STPP (tripolyphosfate de sodium). La bande d'absorption obtenue à 3422 cm^{-1} attribuée au groupe –NH dans le chitosane a été élargie par les interactions physiques avec le STPP **(Ibezim et *al*., 2011)**. En fait, les bandes fortes obtenues à 3100cm^{-1}, 1739.6 cm^{-1}, 1375.7cm^{-1}, et à 1274.2cm^{-1}, indiquent la présence d'étirement asymétrique et symétrique dans les groupes CH_2, NH_3^+, C=O s'étirant dans les amides, flexion NH, flexion en place OH dans les alcools et étirage P=O **(Lee et *al*., 2001)**. Tandis que le pic 1619.4cm^{-1} concerne la liaison de l'ammonium et des ions phosphoriques.

Les bandes d'adsorption observées dans la région comprise entre 962.1cm^{-1} et 1274.2cm^{-1} correspondent à la vibration d'étirement de P=O et P-O de l'ion tripolyphosphate **(Ibezim et *al*., 2011; Hosseini et *al.*, 2013)**.

Tableau 14: Les constantes et les coefficients de corrélation de la diffusion intraparticulaire du bleu de méthylène (MB) et du rouge Congo (CR).

Colorants	k_{i1} (mg g^{-1} min$^{1/2}$)	R^2	k_{i2} (mg g^{-1} min$^{1/2}$)	R^2
MB	9.334	0.995	0.713	0.974
CR	3.256	0.992	0.087	0.721

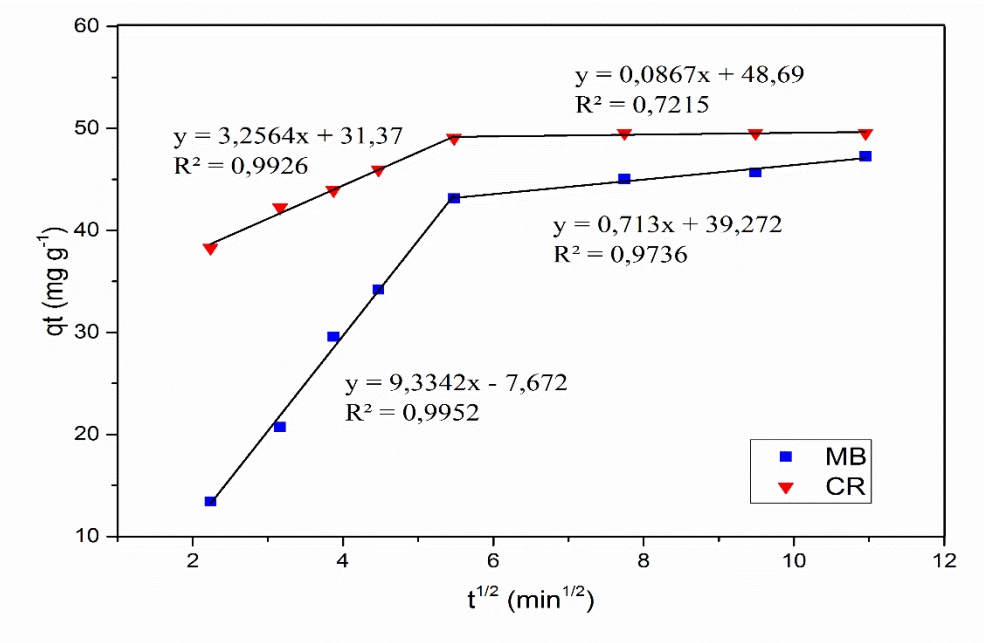


Figure 23 : Modèle de diffusion intra-particulaire de l'adsorption de bleu de méthylène et rouge de congo (m=0.25g, C_0=100 mg.L^{-1},T=20 °C et V=50mL).

Après adsorption du nickel dans le nanochitosane, le pion de 1274.2cm^{-1}, en raison de la liaison des groupes phosphopriques et des ions métalliques du nickel, a disparu. L'apparition d'une nouvelle bande intense à 1554.9cm^{-1} peut être attribuée à la vibration de flexion du groupe NH_2 indiquant l'implication de groupes amine dans la complexation du nickel **(Taboada et *al*., 2003)**.

Dans la bande à 2900cm^{-1} on observe une diminution d'intensité de la bande d'élongation vibrationnelle des groupes CH_2 indiquant un changement de l'environnement des groupes -NH_3^+. Un changement remarquable d'intensité des bandes à 1427cm^{-1} du COO-, et de la bande à 1311.1cm^{-1} du groupe SiO dû à l'augmentation de leur intensité est observé. Ce changement est provoqué par la destruction des liaisons entre les groupes amine du nanochitosane et ces groupes, il peut s'expliquer par la coordination des groupes amine et ceux de l'ion métallique.

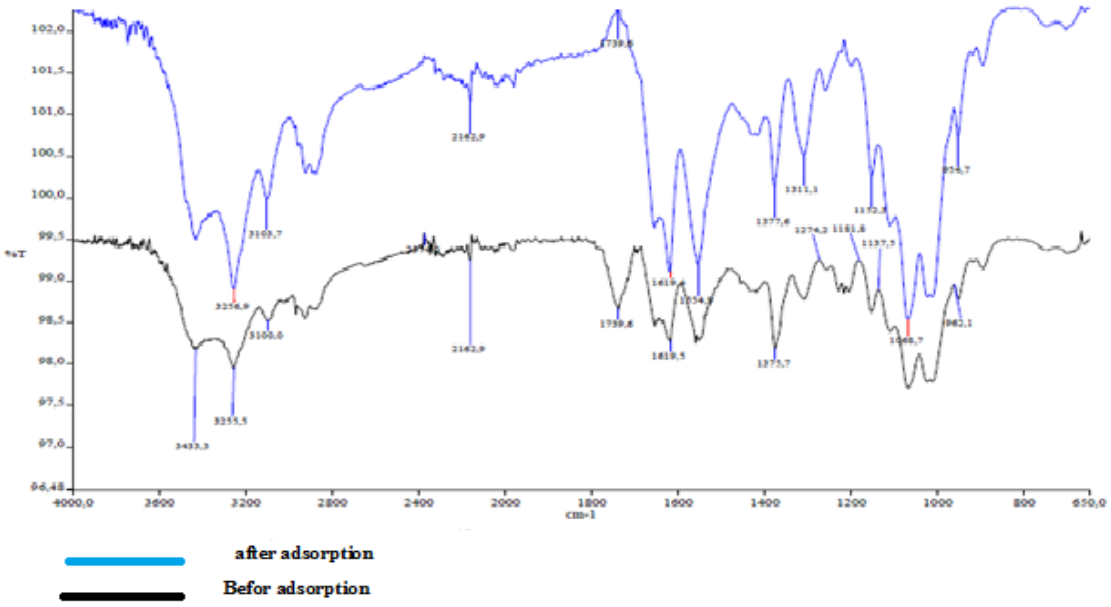


Figure 24 : Les spectres infra rouge de Fourrier (FTIR) du nanochitosane avant et après l'adsorption de nickel(II).

III.2.1.2. Etat du potentiel zêta du nanochitosane

Le pH_{pzc} (pH auquel la charge électrique est nulle à la surface de l'adsorbant) est un paramètre très important expliquant le processus d'adsorption en termes d'attractions électrostatiques entre la surface chargée de l'adsorbant et les polluants.

Le pH_{pzc} du naochitosane est mesuré dans une gamme de pH comprise entre 3 et 9 correspondant à des valeurs potentielles comprises entre 8.1mV et -18.2mV. Le résultat de potentiel zêta du nanochitosane à différentes valeurs de pH est présenté sur la figure 25. Le pH_{pzc} du nanochitosane diminue presque linéairement avec l'augmentation du pH. Ā pH= 4 et pH=6, le nanochitosane présente une une valeur positive de son potentiel pH_{pznc} et cela indique l'existence degroupes fonctionnels chargés positivement représentés par des groupes amine. Lorsque le pH est supérieur à 7, nous constatons une diminution des valeurs du potentiel zeta du nanochitosane ; cette diminution indique l'abaissement de la concentration des protons. Il semblerait que les protons sont impliqués dans la désionisation de groupes fonctionnels, notament la fonction carboxyle. Les valeurs négatives du potentiel zêta peuvent être dues aux interactions moléculaires de la réticulation ionique chitosane-TPP(Tripolyphosphate)et les énergies d'interaction ont été étudiées dans une étude précédente **(Koukaras et *al*.,2012).**

III.2.1.3. Résultat d'analyse comparée par la MEB-EDS

Le microscope électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau focalisé d'électrons à haute énergie pour générer une variété de signaux à la surface des spécimens solides. Les signaux qui dérivent des interactions électron-échantillon révèlent des informations sur l'échantillon, y compris la morphologie externe (texture) et la composition chimique, cristalline ou amorphe et l'orientation des matériaux constituant l'échantillon **(El-Aassar, 2012; Shih et *al*., 2009)**.

L'image MEB du nanochitosane (fig.26A) démontre la bonne dispersion de la nanoparticule qui s'est avérée avoir une structure en forme de tige. La surface du nanochitosane a une structure relativement rugueuse et inégale présentant une caractéristique amorphe. La capacité et le nombre de sites pour l'adsorption d'ions métalliques augmente avec la rugosité croissante de la surface adsorbante **(Hokkanen et *al*., 2014)**.

Les observations faites dans ce travail sont en accord avec celles de **Vijayalaskshmi et *al*. (2017)** et de **Elayaperumal et *al.* (2018)**.

Après l'adsorption du nickel sur les nanochitosanes, la morphologie de surface a radicalement changé ; la présence de particules blanches de NI (II) confirme que l'adsorption des ions Ni (II) avait eu lieu (fig.26 C et D).

La méthode MEB-EDS est une spectroscopie courante pour identifier les éléments chimiques distribués à la surface du nanochitosane, et également pour fournir des données supplémentaires sur les substances existantes à la surface.

L'analyse MEB-EDS a montré que la composition consiste en 60% de carbone (C), 38% d'oxygène (O) et 0.5% d'aluminium (Al) (fig.27A). Les ions aluminium qui étaient initialement présents dans le nanochitosane ont été éliminés au cours du processus d'adsorption du nickel. **Lima et *al*. (2011)** suggèrent que cela est dû au fait que les ions Ni (II) ont remplacé l'aluminium (fig.27B).En fait, la micrographie MEB-EDS du nanochitosane prise après adsorption montre un pic caractéristique dû au Ni (II). À la lumière des résultats obtenus à partir de l'analyse MEB-EDS, il apparaît que le nanochitosane est un très bon adsorbant pour une applicabilité pratique pour l'élimination du Ni (II) contenu dans des solutions aqueuses.

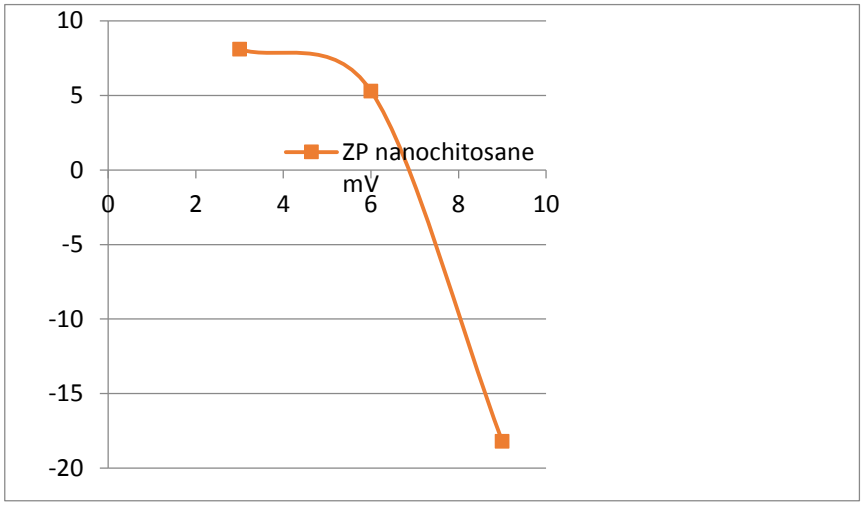


Figure 25: Potentiel zêta du nanochitosane.

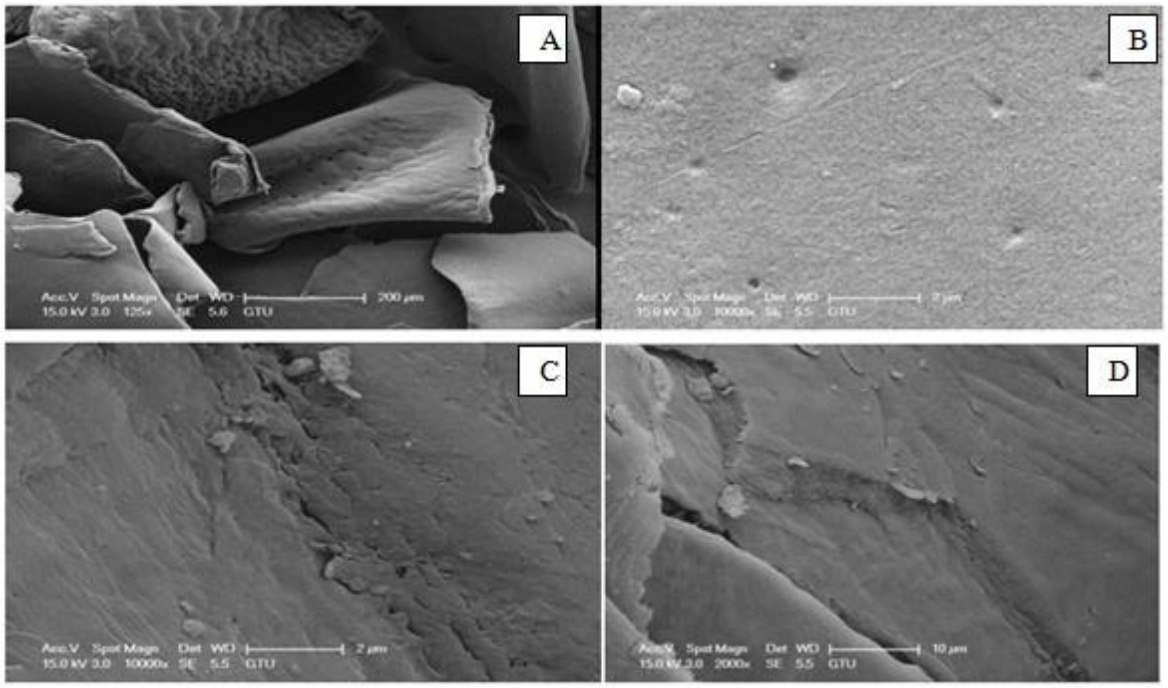


Figure 26 : Micrographe MEB de nanochitosan avant adsorption (A et B) et après adsorption (C et D)du nickel.

III.2.2. Facteurs de variation du pouvoir adsorbant du nanochitosane

III.2.2.1. Effet du temps d'interaction

L'optimisation du temps d'interaction entre l'adsorbant et l'adsorbé est une opération nécessaire à réaliser pendant le processus d'adsorption par lots pour atteindre l'équilibre (c'est-à-dire que la quantité adsorbée ainsi que la concentration restent inchangées ou stables). Le temps d'équilibre est le moment où tous les sites du nanochitosane sont occupés et qu'aucune possibilité de fixation du Nickel Ni (II) sur le matériau adsorbant ne soit possible.

Cette cinétique d'adsorption a été étudiée dans le cas du nickel dans un temps variable de 0 à 360min. Le résultat est reporté sur la figure 28 qui montre qu'il y avait une adsorption rapide dans les 120 premières minutes, car l'équilibre d'adsorption a été atteint en 240 min. La quantité maximale de Ni (II) adsorbée après 360min d'interaction avec l'adsorbant est de l'ordre de 87.7mg/g, soit avec un pourcentage équivalent à 81.38%.

Cette augmentation initiale rapide de la quantité de nickel adsorbée était principalement attribuée à un plus grand nombre de sites vacants disponibles et à la grande surface de nanochitosane **(Deepa et Suresha, 2014)**. En effet, au-delà d'un certain temps de contact, les sites d'adsorption des nanochitosanes s'épuisent et conduisent à une baisse de l'élimination des ions Nickel Ni (II) **(Lakherwal et *al.*, 2016)**. Cependant, il avait été signalé que la sorption du nickel à partir de solutions aqueuses par le chitosane nécessitait beaucoup de temps **(Zhang et *al*., 2001).**

III.2.2.2. Effet du pH de la solution d'ions métalliques

En plus des nombreux facteurs (les propriétés des biosorbants**,** la disponibilité des ions métalliques dans les solutions et ainsi que le nombre de sites de liaison sur l'adsorbant) affectant le processus d'élimination des ions métalliques, le pH de la solution d'ions métalliques constitue également un facteur essentiel au phénomène de l'adsorption **(Putra et *al*., 2014)**(fig.29).

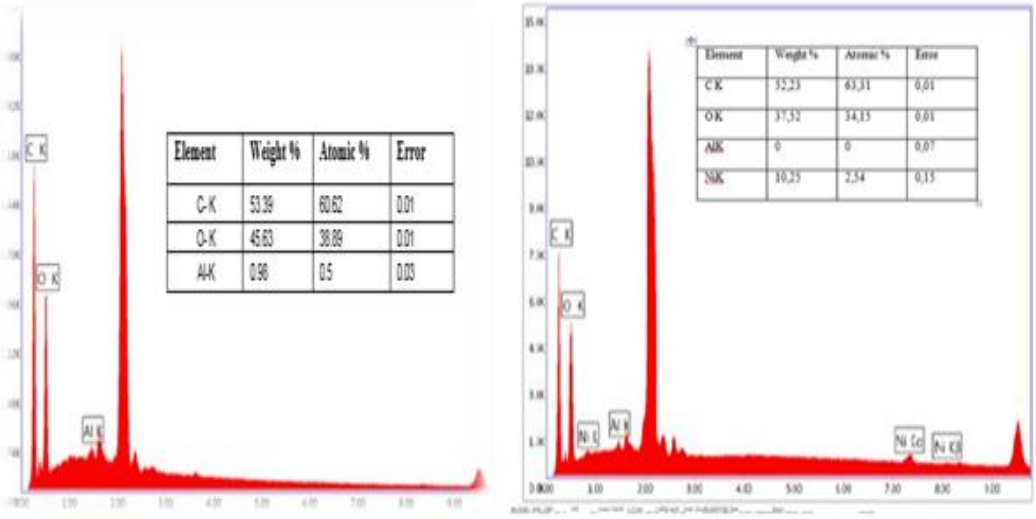


Figure 27 : Spectres EDS et les éléments de surface trouvés sur le nanochitosane avant et après l'adsorption.

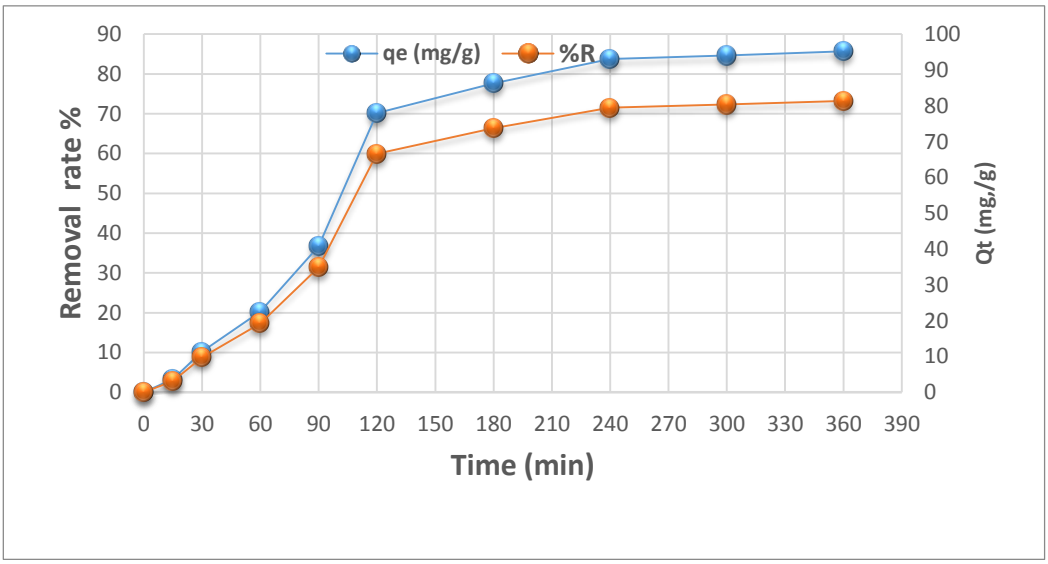


Figure 28: Effet du temps de contact dans l'adsorption du Nickel(II) par le nanochitosane (m=0.1g, C_0=210 mg.L^{-1}, T=20°C, V=0.05L, pH= 9).

Lorsque le pH diminue dans la solutionmétallique, les groupes amine présents dans les nanoparticules de chitosane commencent à protoner à divers degrés; ainsi, le nombre de points disponibles pour chélater les ions métalliques diminue, et conduit à une répulsion électrostatique des cations métalliques (**Chu,2002**).

En revanche, à pH plus élevé, les ligands de l'adsorbant, peuvent augmenter la densité de charge négative à la surface des ligands et, par conséquent, l'adsorption électrostatique d'ions métalliques chargés positivement à la surface des ligands augmente et le pourcentage d'adsorption augmente. À un pH supérieur à 5, en raison de l'augmentation des ions OH^-, la pénétration des ions dans la structure des nanoparticules de chitosane crée certaines couches sédimentaires et conduit à une réduction de la surface de l'adsorbant et de la quantité d'ions métalliques éliminés **(Mi et al., 1999; Kaloti et Bohidar, 2010)**.

III.2.2.3. Effet de la concentration initiale en nickel

L'effet des concentrations initiales sur l'élimination et l'élimination du nickel (II) sert de force motrice importante surmontant la résistance au transfert de masse de Ni (II) entre la phase aqueuse et solide. Les effets de différentes concentrations initiales de Ni (II) (50 mg/l -374,4 mg/l) sur la capacité d'adsorption du nanochitisan sont présentés sur la figure 30.

Le pourcentage d'adsorption du nanochitosane sur Ni(II) a été augmenté avec l'augmentation de la concentration initiale de Ni(II). Ces résultats obtenus ont été remarqués car des concentrations plus élevées de Ni (II) conduisent à un gradient de concentration accrue. Ce qui conduit à une probabilité plus élevée de collision entre les ions nickel et les sites actifs du nanochitosane, c'est ainsi que la capacité d'adsorption augmente jusqu'à la concentration de 210,6mg/l où les sites d'adsorption actifs se sont saturés **(Shroff et Vaidya, 2011)**.

En outre, l'adsorption rapide initiale observée peut être attribuée à la disponibilité de nombreux sites de surface, qui sont occupés, suivi d'une réduction du taux d'adsorption.

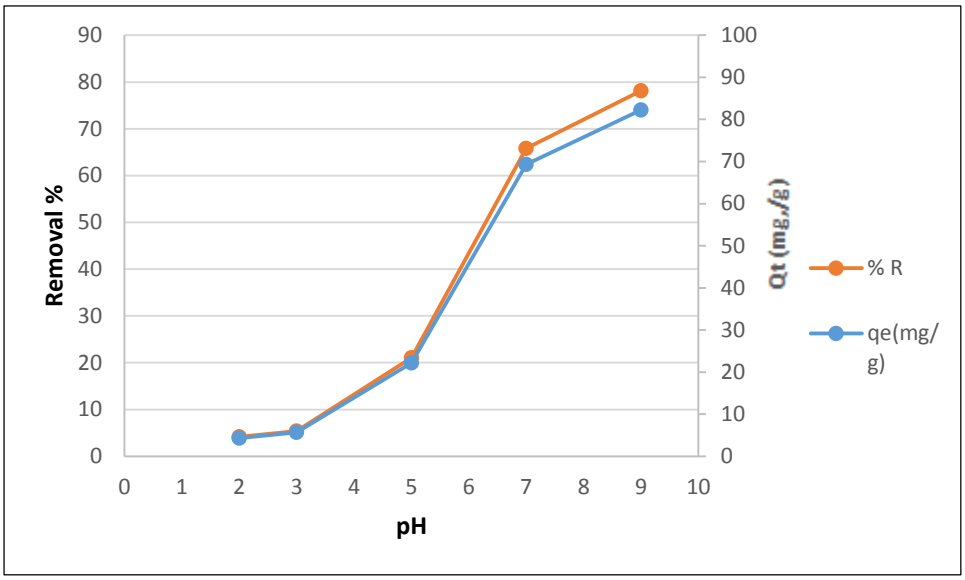


Figure 29 : Effet du pH de la solution de nickel sur l'adsorption du Nickel(II) par le nanochitosane (*m*=0.1g, C_0=210 mg.L^{-1}, *T*=20°C, *V*=0.05L, T=360min).

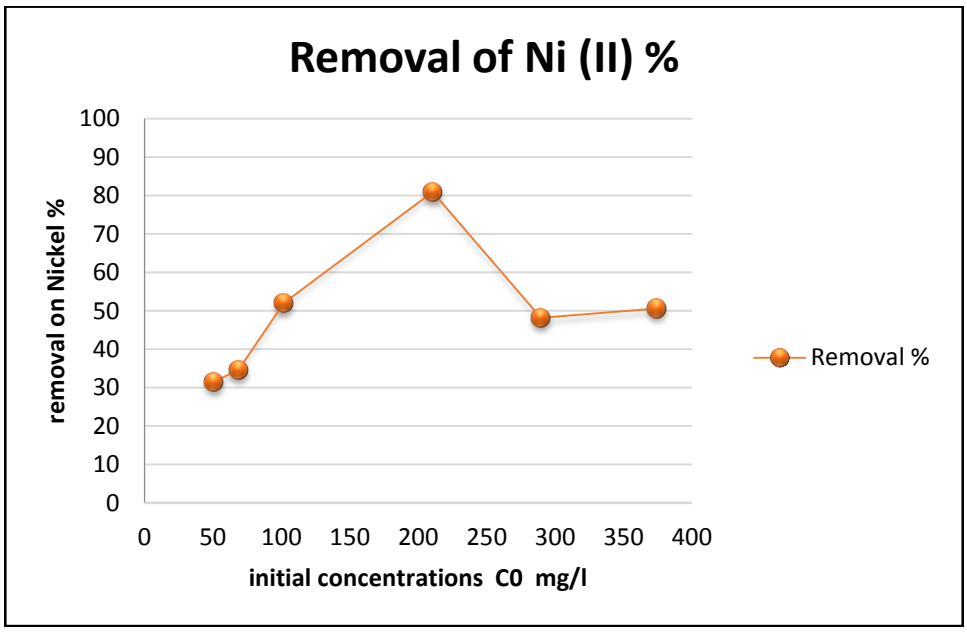


Figure 30: Effet de la concentration initiale en nickel sur l'adsorption du Ni(II) par le nanochitosane (*m*=0.1g^{-1}, *T*=20°C, *V*=0.05L, T=360min, pH=9).

Une fois que les ions nickel ont occupé ces sites, le reste de la solution doit ~~se~~ diffuser dans les sites internes; de plus, les sites de surface occupés auront également tendance à repousser ceux qui viennent, ce qui entraînera une réduction supplémentaire du taux d'adsorption **(Kumar et *al*., 2010)**. Par conséquent, la concentration initiale de Ni(II) = 210.6mg/L a été choisie comme concentration initiale idéale pour toutes les expériences ultérieures.

III.2.2.4. Effet de la température

La figure 31 indique clairement que la capacité d'adsorption des ions NI (II) augmente avec l'augmentation de la température (25°C-50°C). Cette augmentation en fonction de la température peut être due à une mobilité croissante des ions métalliques qui conduit à accélérer l'occasion de leurs collisions mutuelles et cela se traduit par une augmentation de la capacité et de l'efficacité de leur adsorption **(Zhang et *al.*, 2014)**.

On observe une diminution de la capacité d'adsorption lorsque la température dépasse 50°C et cela peut être dû à l'affaiblissement des forces de liaisons existantes entre les cations métalliques et les sites actifs présents à la surface de l'adsorbant. À 50°C, le taux de désorption sur la surface s'accélère, ce qui entraîne une tendance accrue de l'ion métallique à s'épuiser de la surface, et donc la diminution de l'adsorption a été atteint **(Zhang et *al.*, 2011)**.

III.2.3. Réutilisation du nanochitosane dans l'adsorption du nickel(II)

La capacité du nanochitosane à se régénérer pendant les cycles d'adsorption est un facteur très important dans la conception de la récupération et de la réutilisation des biomatériaux.

Pour vérifier l'efficacité du nanochitosane d'un point de vue économique et de rentabilité, et pour comprendre l'interaction entre le métal et l'adsorbant, des tests de désorption ont été réalisés. Le traitement de l'eau sera économiquement viable si l'adsorbant peut être récupéré et utilisé à plusieurs reprises **(Talaat et *al*., 2011)**.La figure 32 indiquequ'il y aura un bon pourcentage d'élimination au cours des 4 cycles avec un pourcentage de 60% au premier cycle et de 41% au quatrième cycle.

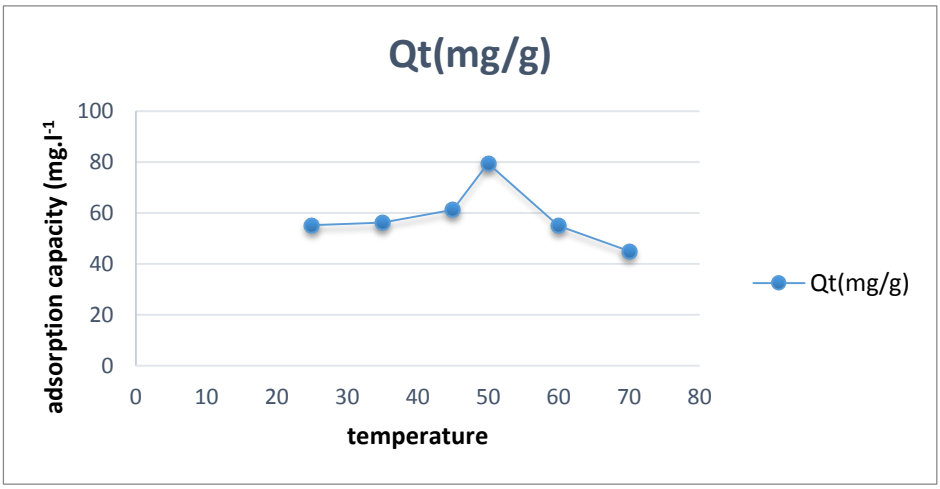


Figure 31: Effet de la température sur l'adsorption du Ni(II) par le nanochitosane (m=0.1g, V=0.05L, t=360min, pH=9, C_0=210.6 mg.L^{-1}).

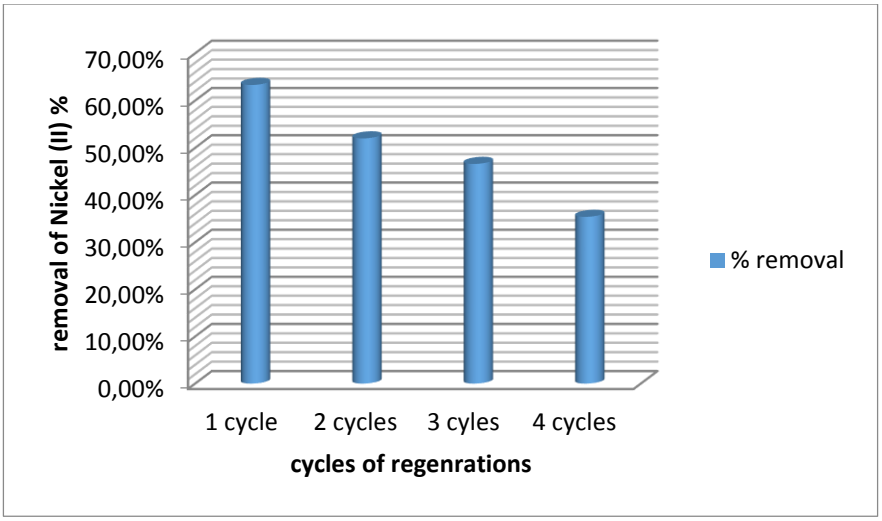


Figure 32: Régénération de nanochitosane dans l'adsorption de Ni(II). (m=0.1g, V=0.05L, t=360min, pH=9, C_0=210,6 mg.L^{-1}).

L'étude de régénération de NaOH (5%) a démontré un pourcentage élevé de réutilisation jusqu'à 4 foissans perte significative. cette diminution résulte probablement de la perte de sites de liaison après chaque étape d'adsorption / régénération **(Zhang et *al.*, 2011)**.

III.2.4. Particularités des isothermes d'adsorption

L'étude des isothermes d'adsorption est un facteur très important pour détailler pleinement le comportement interactif entre le nanochitosane et le nickel(II). Les données expérimentales ont été représentées et analysées par deux types d'isothermes Langmuir et Freundlich (fig.33).

Le tableau 15 montre les constantes de Langmuir et de Freundlich ainsi que le facteur de séparation RL pour le processus d'adsorption du nickel (II) qui a été calculé à l'aide de l'équation 8 (se référer au chapitre II) et qui se situe dans l'intervalle 0.36-0.81, indiquant que le processus d'élimination du nickel était favorable.

La forme des isothermes de Langmuir et de Freundlich pour le nickel apparaît linéaire avec les coefficients de corrélation trouvés extrêmement élevés R2 > 0,94 avec une capacité d'élimination maximale de 45.66mg/L. L'analyse des résultats de modélisation a clairement montré que le modèle de Freundlich donnait le meilleur ajustement des données expérimentales ; ce qui nous permet de dire que le nanochitosane est un bon adsorbant à haute efficacité.

III.2.5. Cinétique d'adsorption du nickel par le nanochitosane

III.2.5.1. D'après le modèle pseudo premier et second ordre

Pour étudier la cinétique d'adsorption des métaux lourds dans des solutions aqueuses à un intervalle de temps, les données expérimentales trouvées sont analysées à l'aide de trois modèles: premier pseudo ordre, second pseudo ordre et diffusion intraparticulaire **(Lakshmipathy et Sarada, 2015)**.

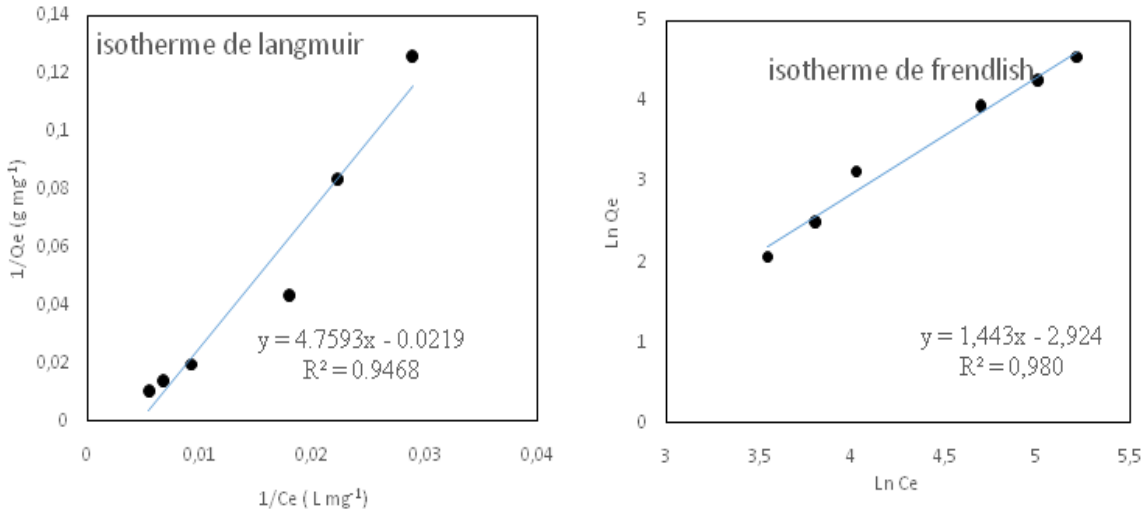


Figure 33 : Isotherme d'adsorption du Ni(II) de Langmuir et de Freundlich
(*m*=0.1 g, *T* =20 °C et *V*=0,05L).

Tableau 15: Les coefficients de corrélation et les constants des modèles d'isothermes utilisés.

	Isotherme de Langmuir			Isotherme de Freundlich			Paramètre de separation
	Q_m (mg.g^{-1})	b (L mg^{-1})	R^2	K_{Fen} (mg g^{-1})(L mg^{1})$^{1/n}$	n	R^2	R_L
Ni	45.662	0.0046	0.9468	18.6230	0.4432	0.9807	0.3673 – 0.8116

Tableau 16: Les coefficients de corrélation et les constantes de la cinétique d'adsorption du nickel par le nanochitosane.

	Pseudo-first order			**Pseudo-second order**			
	k_1 (min^{-1})	q_e (*m*g g^{-1})	R^2	k_2X10^4 (g mg^{-1} min^{-1})	q_e (*m*g g^{-1})	h (mg g^{-1}min^{-1})	R^2
Ni(II)	0.096	85,7	0.845	2.425	85,7	1.000	0.996

Le tableau 16 montre que les constantes et les coefficients de corrélation calculés sont de bons coefficients obtenus pour le modèle du pseudo-second ordre (on utilise les équations 4 et 6 citées au chapitre II) par rapport à celui du pseudo-premier ordre, cela indique que le processus d'adsorption du nickel suit le pseudo modèle deuxième ordre. Nos résultats obtenus sont en accord avec ceux de **Vijayalaskshmi et *al.* (2017)**.

III.2.5.2. D'après la diffusion intra particulaire

La diffusion intraparticulaire de l'adsorption entre la phase solide et la phase liquide est illustrée par la figure 34 où l'on on observe deux parties linéaires distinctes qui montrent qu'il y aura deux mécanismes de diffusion complètement différents. Si la saturation est atteinte, les ions nickel sont passés dans les pores du nanochitosane et ont été adsorbés par les surfaces internes. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Soltani et *al.*(2013)** l'élimination des colorants par le nanochitosane. Les constantes et les coefficients de ce modele sont résumés dans le tableau 17.

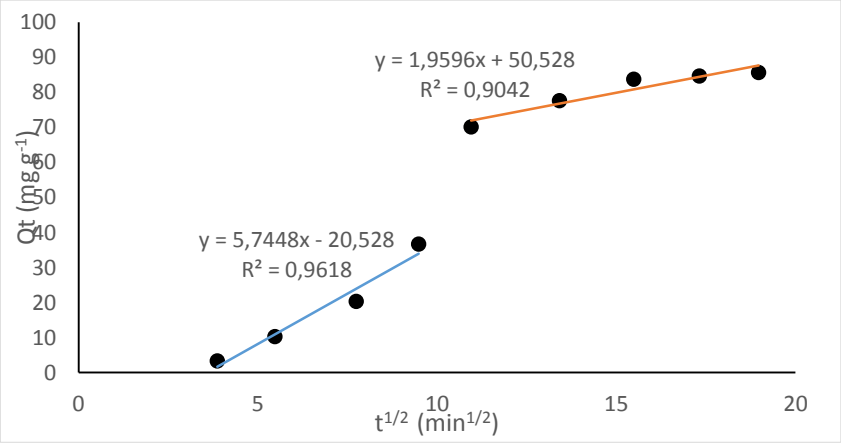


Figure 34: Modèle de diffusion intra-particulaire d'adsorption du Nickl(II)
(m=0.1g, C_0=210.6mg.L^{-1}, T=20 °C et V=0.05L).

Tableau 17 : Les constantes et les coefficients de corrélation de la diffusion intra particulaire du nickel.

	k_{i1}(mg g^{-1} min$^{1/2}$)	R^2	k_{i2} (mg g^{-1} min$^{1/2}$)	R^2
Ni	5.7448	0.9618	1.9596	0.9042

III.3. Pouvoir d'absorption des biofilms élaborés à partir des bactéries isolées du criquet Pèlerin vis-à-vis du cobalt et du nickel

III.3.1. Résultat d'isolement et identification des bactéries isolées de chez le criquet pèlerin

III.3.1.1.Isolement des souches a partir de criquet pèlerin

L'isolement est effectué sur le milieu gélose nutritive ; nous avons dénombré les isolats qui sont caractérisés par une pigmentation jaune, un aspect granuleux avec des colonies rondes. Au final, il y eu 13 isolats retenus dans cette étude.

Le critère le plus important et le plus distinctif c'est la pigmentation apparente à la surface cellulaire de la bactérie qui agit comme un antioxydant vis-à-vis des différents stress **(Asker et *al.*, 2007)**.

Les bactéries isolées à partir du criquet pèlerin ont fait l'objet d'une caractérisation basée essentiellement sur le pouvoir de production des exopolysaccharides (qui sont à la base de la formation de biofilms), sur des critères morphologiques, et sur une identification moléculaire basée sur un séquençage d'ADN 16S.

III.3.1.2. La coloration de Gram

Après la purification des deux souches et une coloration rapide de GRAM, les colonies ont été observées au microscope optique entre lame et lamelle. Les cellules apparaissent sous la forme de bâtonnets, avec une couleur violette; donc les deux bactéries S10 et S13 sont Gram négative (fig35).

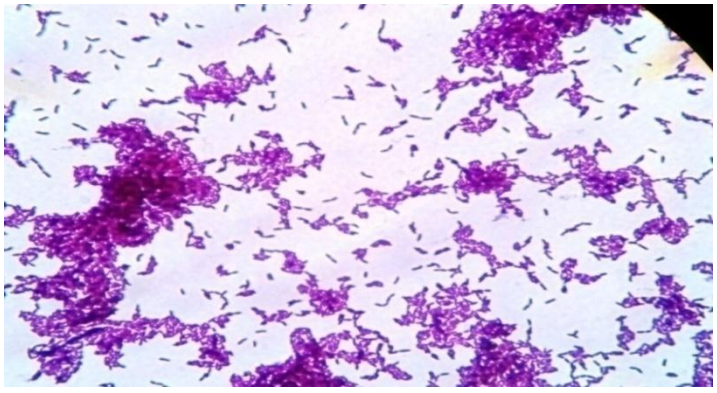


Figure 35: Coloration du GRAM des souches utilisées.

III.3.1.3. Identité génétique des souches bactériennes

Le séquençage et l'identification moléculaire des deux souches a été réalisée par alignement des séquences en utilisant le basic blast (fig. 36 et 37) :

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Il est important de noter que les deux souches identifiées présente le même genre *Sphingomonas*. Sur le plan de l'espèce, la souche S10 désignée *Sphingomonas sp* n'a pas pu être apparentée ; alors que la souche S13 s'apparente à *Sphingomonas echinoides*. Les souches de *Sphingomonas* sont connues pour produire des biopolymères extracellulaires, y compris certains exopolysaccharides liés au gellane (**Lobas et *al.*, 1992; Martins et *al.*, 1996; Hashimoto et Murata, 1998).** Une forte capacité de production d'exopolysaccharides (EPS) par ce genre bactérien lui confère un pouvoir élevé de formation de biofilms. Ce genre bactérien intervient dans la biodégradation des hydrocarbures (du naphtalène, du phénanthrène, de l'acénaphtène et de l'anthracène) (**Janikowski et *al.*, 2002**).

III.3.2. Pouvoir de production des exopylsaccharides (EPS)

L'attachement des bactéries à une surface solide formant un biofilm peut être décrit par un processus en deux étapes: premièrement, les microorganismes se rapprochent suffisamment de la surface pour être faiblement maintenus par les forces électrostatiques (à ce stade, les cellules peuvent être facilement retirées de la surface) et deuxièmement, les microorganismes attachés sont plus difficiles à éliminer de la surface, car les bactéries produisent des exopolysaccharides qui finissent par former la matrice du biofilm qui adhère fermement au sous-trait **(Parkar et *al.*, 2001)**. Le polyssacharide et le filet polymère donnent des informations importantes sur la capacité de formation de biofilm par le microorganisme.

Parmi les 13 souches isolées chifrées S1,S2, …….., S13. La production d'EPS est plus élevée pour S10 (2.8g/L) et S13 (2.87g/L) (tableau 18). Ces valeurs sont obtenues par extrapolation à partir d'une courbe d'étalonnage de glucose (fig.38). Ce sont, évidement, les deux souches S10 et S13 qui ont été utilisées dans la formation de biofilms chélateurs des deux métaux, le Nickel et le Cobalt.

Souche S10 : Sphingomonas sp

GAGGGCTTGGGCGGGCTGCCTACCATGCAGGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGT
CGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCAGGTTCGGAATAACAGC
GAGAAATTGCTGCTAATACCGGATGATATCGCGAGATCAAAGATTTATCGCCTGA
GGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCGA
CGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTG
ATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACC
CGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
GCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAAT
TGCCTTTAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGT
AGAGGTGAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTG
GACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCGGGGCTCTTAGAGCTT
CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCC

Figure 36: Séquençage de la souche S10.

Souche S13 : *Sphingomonas echinoides*

CCTGAACTGGCGGCTGCCTACACATGCAGTCGACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGC
GCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCAGGTTCGGAATAACAGCGAGA
AATTGCTGCTAATACCGGATGATATCGCGAGATCAAAGATTTATCGCCTGAGGAT
GAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCGACGAT
CCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC
CAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGG
GATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGTAGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAATTGC
CTTTAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGA
GGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGA
CTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCGGGGCTCTTAGAGCTTCG
GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGG

Figure 37:Séquençage de la souche S13.

La présence de sites de liaison permetaux EPS non seulement de séquestrer les minéraux et les nutriments pour la croissance microbienne, mais aussi d'éliminer les métaux toxiques dans le traitement biologique des eaux usées **(Liu et Fang, 2002)**.

III.3.3. Efficacité des biofilms élaborés dans l'adsorption du cobalt et du nickel

Les résultats obtenus dans les essais de biosorption par lots ont montré des différences sur les performances de biosorption entre les deux métaux lourds étudiés (Cobalt et Nickel). Ces différences sur la capacité de biosorption sont dues aux propriétés chimiques de chaque métal tels que la valence et le poids atomique, ainsi qu'aux propriétés des bactéries formants les biofilms telles que la structure, les groupes fonctionnels et la surface (**Sari et *al.*, 2007)**.

Selon les études réalisées par **Unuabonah et *al.*** (**2007**), le mécanisme de la biosorption implique généralement deux types de réaction :

- une réaction chimique entre les groupes fonctionnels de surface sur les biosorbants et les ions métalliques, formant des complexes métal-inorganique/organique.
- une réaction d'échange de cations due a une capacité échange élevé de la capacité des cartions.

La dynamique de biosorption suit trois étapes consécutives: transport du soluté de la solution en vrac à travers le film liquide vers la surface extérieure de l'adsorbant, diffusion du soluté dans le pore de l'adsorbant et enfin adsorption du soluté sur la surface intérieure des pores et des espaces capillaires de l'adsorbant.

Dans le présent travail, l'élimination des ions métalliques a été rapide et a présenté une cinétique de biosorption typique, qui comprend deux phases: la première est associée à la surface cellulaire externe et la deuxième est une reaction d'accumulation intracellulaire, dépendante du métabolisme cellulaire (**Lameiras et *al.*, 2008**).

Tableau 18 : Capacité de production des exopolysaccharides (EPS) par les souches isolées.

Codes des souches isolées	Densité optique de la culture	EPS produiten g/L
S1	0.05	0.18
S2	0.09	0.32
S3	0.1	0.35
S4	0.04	0.14
S5	0.13	0.46
S6	0.10	0.35
S7	0.19	0.68
S8	0.20	0.75
S9	0.21	0.75
S10	0.78	**2.80**
S11	0.25	0.90
S12	0.07	0.25
S13	0.80	**2.87**

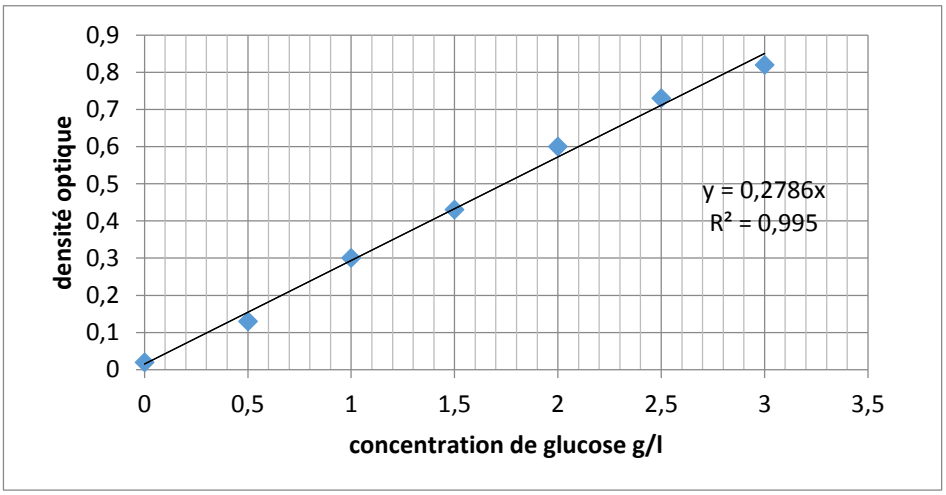


Figure 38: Courbe d'étalonnage de glucose.

III.3.4. Résultat d'analyse du pouvoir adsorbant des souches de *Sphingomonas echinoides* isolées de chez le criquet pèlerin

L'application d'un tel système de rétention dans des situations pratiques dépend de nombreux facteurs, dont l'un est la concentration initiale de métal dans la solution aqueuse. Comme ce procédé doit être appliqué à des solutions diluées, la gamme de concentrations initiales testée a été définie de 15 à 105 mg/L.

La figure 39 montre que le pourcentage d'élimination du Nickel (II) par les biofilms des deux souches *Sphingomonas* augmente (71.86% jusqu'àu 78.77%) avec l'augmentation de la concentration initiale de 15 à 70 mg/L. L'augmentation de la capacité d'adsorption des deux biofilms avec l'augmentation de la concentration initiale du métal pourrait être attribuée à une probabilité plus élevée de collisions entre les ions métalliques et les adsorbants **(Oztürk et *al.*, 2004)**.

Au-delà d'une concentration initiale de 70mg/L,on observe une diminution du pourcentage d'élimination; cela peut être due à une saturation des sites d'adsorption disponibles à la surface des biofilms.

Le pourcentage maximal d'adsorption est atteint à une concentration initiale en nickel de 70mg/L (76.86% pour la souche *Sphingomonas sp.*, et 73.83% pour la souche *Sphingomonas echinoides).* Il est à oter que d'une manière globale, le biofilm de*Sphingomonasechinoides* a un pouvoir d'élimination du nickel (II) plus élevé que celui de *Sphingomonas sp.*

L'adsorption du cobalt par les deux souches augmente avec l'augmentation de la concentration initiale du métal. L'adsorption maximale du cobalt est atteinte à une concentration initiale en cobalt de 73.58mg/L avec un pourcentage d'élimination égal à 78.77**%** et 72.81% pour *Sphingomonas echinoides* et *Sphingomonas sp*, respectivement.
Lorsque cette concentration est dépassée, il y a une diminution du pourcentage d'adsorption en raison de la saturation des sites actifs.(fig.40).

L'accumulation et la performance d'adsorption du Nickel(II) et du Cobalt (II) par le biofilm de *Sphingomonas echinoides* supporté par la zéolite sont globalement supérieures à celles observées sur le biofilm formé par *Sphingomonas sp*.

III.3.4.1. Résultat de la FTIR avant et après adsorption

Les spectres infra rouges des *Sphingomonas* avant et après l'élaboration et l'adsorption du nickel et cobalt par des biofilms en suspension dans la gamme de 650 à 4000 cm^{-1}, ont été pris pour confirmer la présence de groupes fonctionnels qui pourraient être responsables du processus d'adsorption (voir les figures 41 et 42).

Après 'adsorption, un nouveau pic a été observé au niveau des signes entre 1375.7 et 1455.2cm^{-1} (étirement C-Ode la fonction carboxyle COOH) **(Tunali et *al.*, 2006).**

Le changement observé dans le spectre indique l'implication possible dans le processus de biosorption de ces groupes sur la surface des biofilms. Ces résultats permettent la poursuite de cette étude car les souches isolées présentent les propriétés nécessaires pour une bonne performance de biosorption.

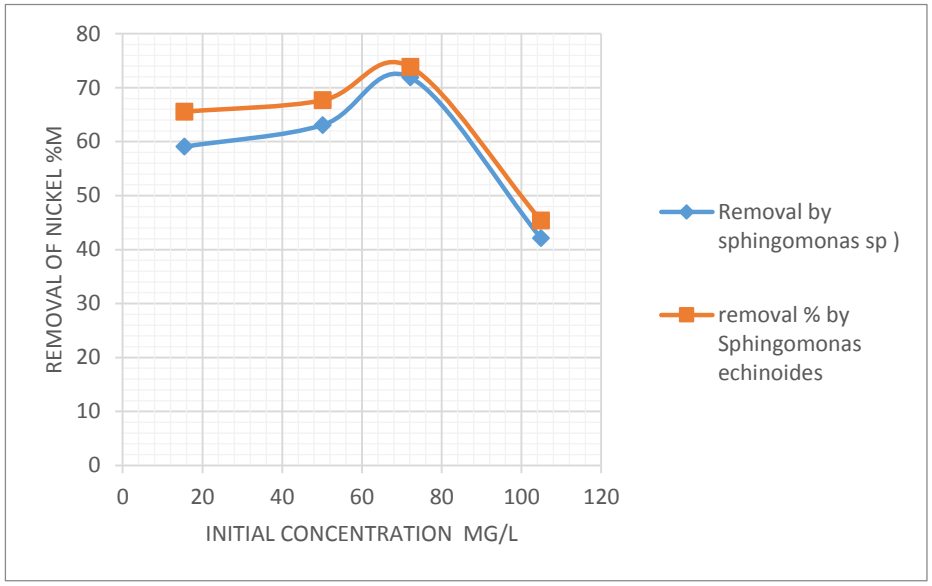


Figure 39 : Elimination du nickel par *Sphingomonas sp*. et *Sphingomonas echinoides***.**

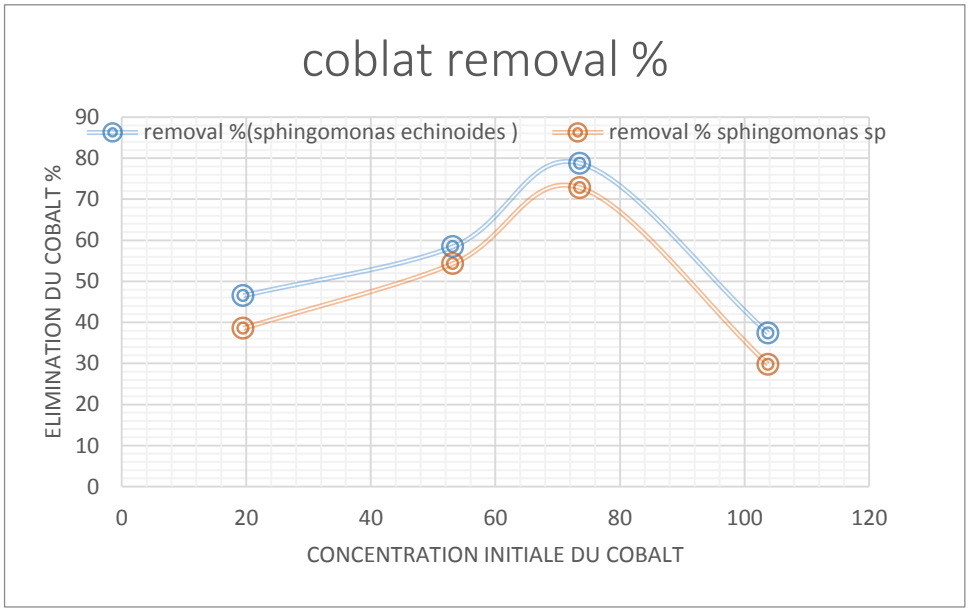


Figure 40: Elimination du cobalt par *Sphingomonas sp*.et S*phingomonas echinoides.*

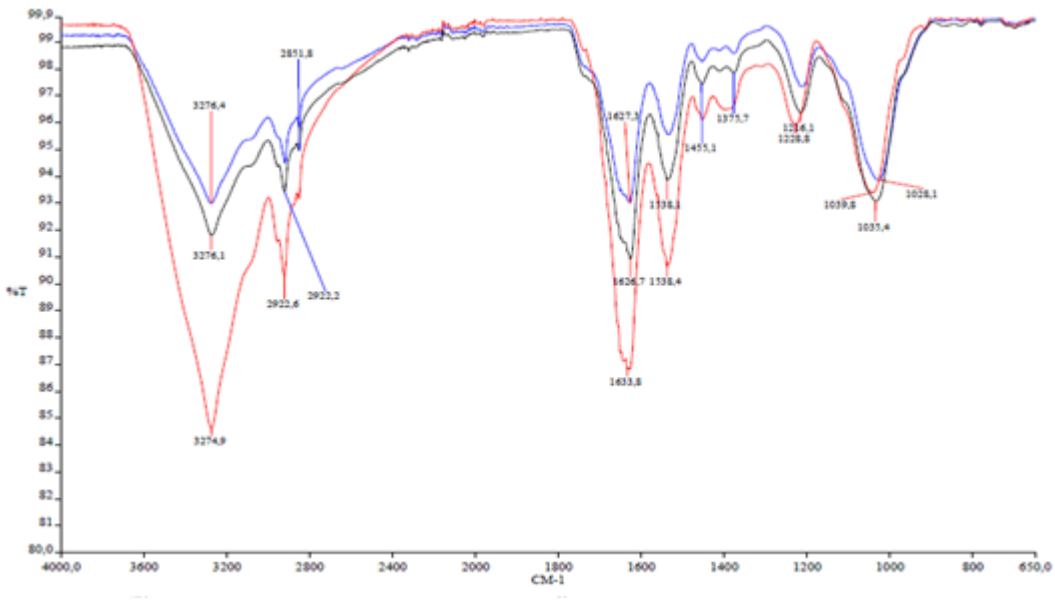


Figure 41: Les spectres infra rouge de la souche S13 avant l'adsorption du nickel et du cobalt (A); après l'adsorption du cobalt (B) et et du nickel (C).

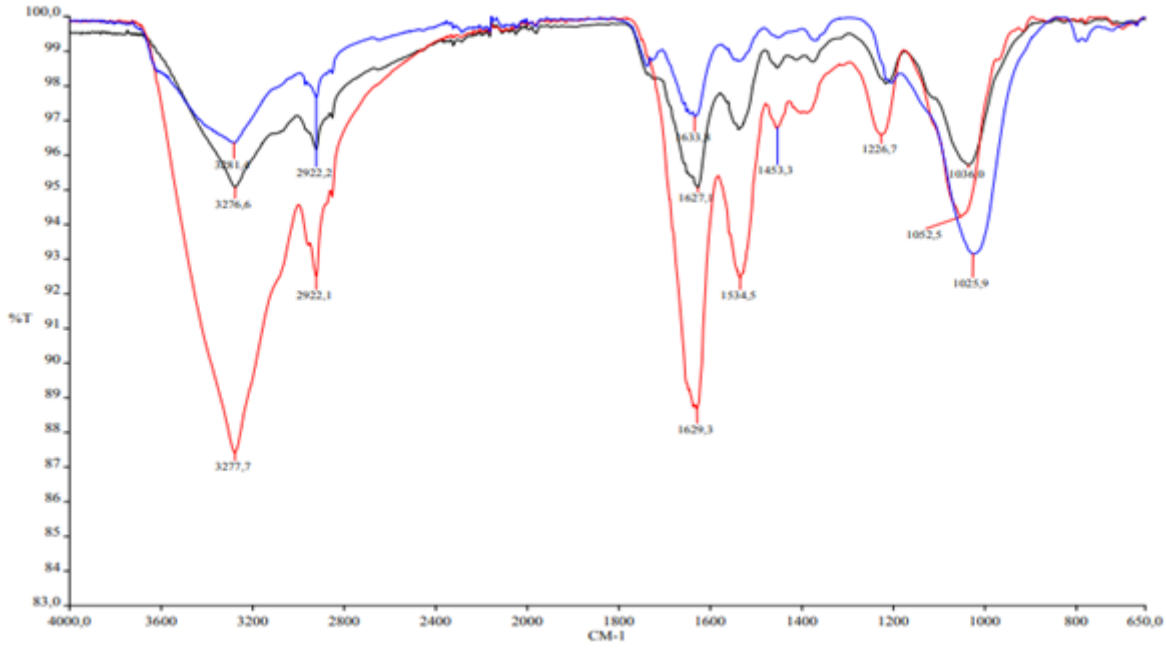


Figure 42: les spectres infrarouge de la souche S10 : avant l'adsorption (A); après l'adsorption (B) et (C) de cobalt et de nickel, respectivement.

III.3.4.2. Résultat de la MEB

La figure 43 montre le résultat d'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) qui illustre l'aspect des souches *Sphingomonas* ayant formé les biofilms avant et après adsorption du nickel et du cobalt. Les deux souches ont une forme de bâtonnets. La figure 42 (C) et (D) démontre que le biofilm couvrait uniformément la surface de la zéolite, avec des taches blanches à la surface de cette dernière qui indiquent l'adsorption des métaux lourds utilisés dans cette étude.

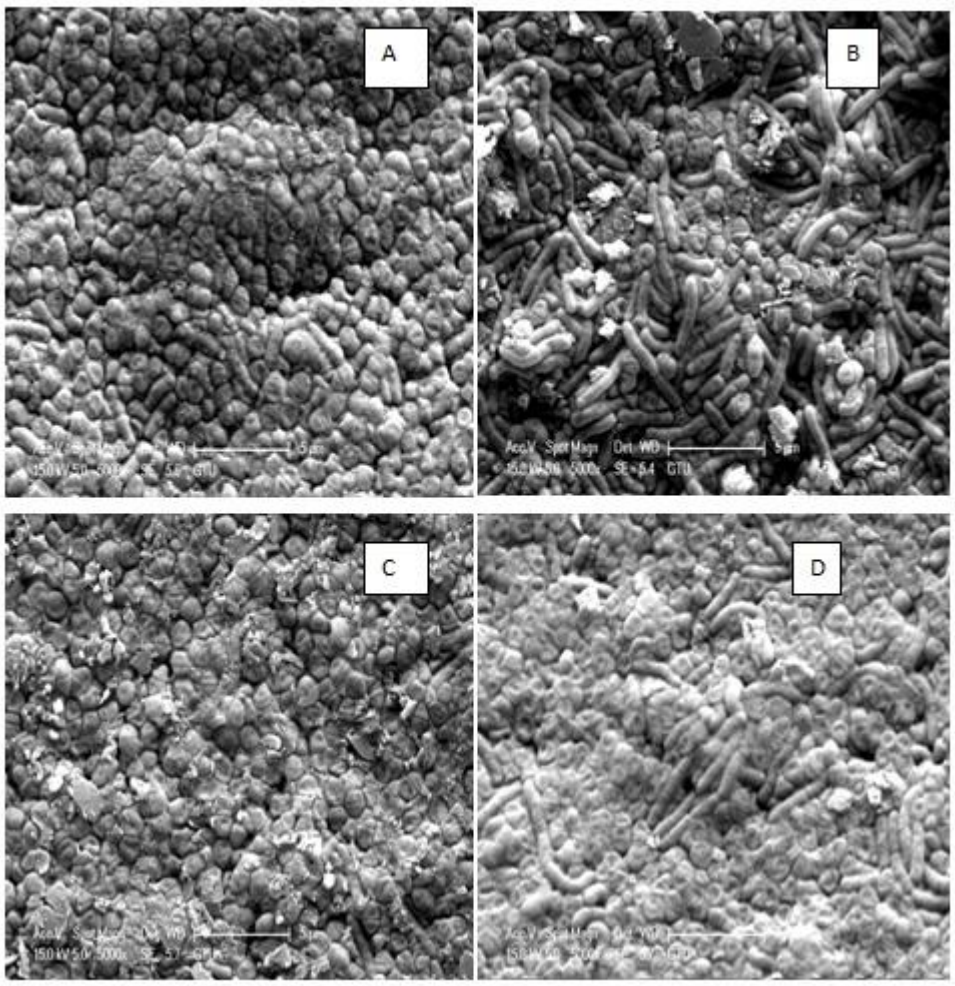


Figure 43: Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) des deux souches *Sphingomonas* : (A) S10 avant adsorption , (B) S13 avant adsorption , (C) S10 après formation de biofilm et adsorption , (D) S13 après formation de biofilm et adsorption.

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de cette thèse était de mettre en évidence la possibilité de l'utilisation du chitosane, du nanochitosane ainsi que des biofilms bactériens pour le traitement des effluents contenant des polluants métalliques et organiques (métaux lourds et colorants), dans le cadre d'une démarche globale de recherche de procédés potentiellement applicables au traitement des eaux usées.

L'idée de choisir le chitosane, le nanochitosane et les biofilms comme adsorbants avait pour objectif de valoriser les déchets de carapaces de crustacées au niveau des pêcheries du littoral algérien particulièrement la Wilaya de Mostaganem d'une part, et d'autre part d'isoler des bactéries non pathogènes à partir des intestins de Criquet Pèlerin et ayant un pouvoir élevé de production des biofilms.

Cette opportunité a été une tentative de bien comprendre le mode de fixation des colorants (rouge Congo et bleu de méthylène) et des métaux lourds (Nickel(II) et Cobalt(II)) par ces adsorbants en solutions aqueuse.
Cette étude nous a permis de dégager les différentes étapes de préparation du chitosane et du nanochitosane à partir des carapaces de crevette.

Par ailleurs, l'opération d'isolement de nouveaux génomes bactériens a conduit à l'obtention de 13 souches bactériennes desquelles deux souches ont été retenues (S10 et S13) après examen morphologique. Leur identification moléculaire par PCR a montré qu'elles s'apparentaient au genre *Sphingomonas* responsable de la formation de biofilm. Une seule espèce a pu être formellement identifiée comme étant *Sphingomonasechinoides*, la deuxième espèce n'a pas pu être identifiée ; il s'agit de *Sphingomonas* sp.

Les essais d'adsorption de nickel et de cobalt par les biofilms formés par les deux bactéries ont montré une meilleure efficacité d'adsorption de ces métaux par le biofilm formé par la souche *Sphingomonasechinoides*. Cette biosorption est directement proportionnelle à la concentration de ces métaux dans la solution aqueuse jusqu'à un certain seuil (70mg/L pour le nickel et 73.58mg/L pour le cobalt), au-delà duquel elle a tendance à diminuer.

L'analyse des adsorbants utilisés par MEB avant l'adsorption montre que la surface du chitosane et du nanochochisane est toujours hétérogène et poreuse ; alors que la surface des biofilms est bien entourée par le support zéolite. Après l'adsorption on constate toujours des taches blanches à la surface des bioadsorbants.

Les spectres infra rouge donne des informations trés utiles sur les groupes fonctionnels des adsorbants notamment les fonctions carboxyle, amine, alcool, méthyle...etc. Ces groupes ont l'opportunité de piégeage des effluents avec la formation des nouveaux pics.

L'effet de facteurs expérimentaux a été étudié en utilisant la technique d'adsorption en batch. Les résultats obtenus montrent une vitesse d'élimination remarquable dans les 30 premières minutes avec des conditions de processus optimales pour les deux colorants. Le pH optimal d'adsorption est égal à 4 pour le bleu de méthylène et à 6 pour le rouge Congo. Les capacités d'adsorption (Qe) du chitosane pour les colorants bleu de méthylène et rouge Congo se situaient, respectivement, dans l'intervalle de 116.3 et 113.6mg.g-1.

L'étude montre que le processus d'adsorption de colorant sur le chitosane peut être décrit à la fois par les deux modèles d'isothermes utilisés, ceux de Langmuir et de Freundlich. Donc, le chitosane utilisé dans cette étude a un pouvoir élevé d'élimination des colorants.

Le nanochitosane préparé et synthétisé à partir du chitosane montre un pouvoir de chélation des ions nickel assez élevé 85.7mg/g dans les conditions optimales: pH=9, concentration initiale = 210.6mg/l et un temps de 360min. Le nanochitosane a une capacité de réutilisation ultérieure supérieur à 4 fois. La cinétique d'adsorption a été bien élucidée par le modèle pseudo second ordre.

L'isotherme d'adsorption du Ni(II) a été étudiée avec des concentrations choisies, et les données expérimentales sont bien interprétées par l'isotherme de Freundlich.

En conclusion, les résultats de cette thèse serviront de plateforme de réflexion sur la possibilité d'utilisation des adsorbants de nature biologique afin d'éliminer les polluants.

Cette étude ouvre un certain nombre des perspectives concernant différents volets qui devraient permettre de confirmer une partie de nos résultats et de compléter cette étude ; il s'agit de :

- Tester les modalités de modification des biomatériaux adsorbants
- Etudier le devenir des biosorbants chargés de polluants
- Améliorer les propriétés des capteurs et résoudre les problèmes méthodologiques;
- La capacité de phytoremédiation assistée par les *Sphingomonas* a été jusqu'à présent sous évaluée. Il serait intéressant de mettre en évidence les caractéristiques spécifiques, les rôles, les avantages et les défis associés à l'utilisation des *Sphingomonas* dans les interactions plante-microbe, de point de vue des futures phytotechnologies.

Références

Bibliographiques

Références bibliograhiques

1. **Abdel-Halim S.H., Shehata A.M.A., El-Shahat M.F. (2003).** Removal of lead ions from industrial waste water by different types of naturals materials. Water Research. 37: 1678-1683.

2. **Acosta M.P., Valdman E., Leite S.G.F., Battaglini F., Ruza S.M.l. (2005).** Biosorption of copper by Paenibacillus polymyxa cells and their exopolysaccharide. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 1157–1163.

3. **AdosindaM., Martins M., Nelson L., & Armando, J. D. *(*2003*).***Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. Journal of Chemosphere .Volume 52, Issue 6 .p 967-973.

4. **Amiali M. (1999).** Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO2, O2). Mémoire de grade : sciences des aliments et de nutrition. Canada: Université Laval.124p.

5. **Anne T.S. et Isabelle F. (2005).** Contamination des Sols: Transferts des sols vers les plantes. EDP sciences et ADEME. Angers cedex. 413 p.

6. **Anžlovar A, Matjaž K, Andraž K, Ema Z.(2018).**Nanocomposites of LLDPE and Surface-Modified Cellulose Nanocrystale Prepared by Melt Processing. J. Molecules :23.1782.

7. **Asker D., Beppu T., Ueda K. (2007).** Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. Applied Microbiology and Biotechnology. 77(2): 383-392.

8. **Azeredo J., Oliveira R. (1996).** A new method for precipitating bacterial exopolysaccharides, Biotechnology Techniques. 10(5): 341–344.

9. **Babu B.V., Gupta S. (2007).** Adsorption of Cr(VI) using activated neem leaves: kinetic studies. Adsorption. 14(1): 85–92.

10. **Baker A.J.M., Walker P.L. (1989).** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. Shaw A.1990. CRC Press.155-177p.

11. **Barranguet C., Veuger B., Van Beusekom S.A.M., Marvan P., Sinke J.J., Admiraali W. (2004).** Divergent composition of algal-bacterial biofilms developing under various external factors. European Journal of Phycology. 40: 1–8.

12. **Baumont S., Camard J-P., Lefranc A., Franconi A. (**2004). Réutilisation des eaux usées: risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France. Rapport d'Observatoire Régionale de la Santé. Paris. 175p.

13. **Bautista-Baños S., Hernandez-Lauzardo A.N., Valle M.G.V., Hernandez- Lopez M., Barka E.A., Bosquez-Molina E., Wilson C.L., Valle M., Tiznando-Hernandez ME., Barka E., Bosquez E. (2006).** Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection. 25(2):108-118.

14. **Berg L.R., Raven P.H., Hassenzah D.M. (2009).**Environnement. 6ème édition. De boeck. Paris. 700p.

15. **Berland J.-M., Juery C. (2002).** Les procédés membranaires pour le traitement de l'eau. Document technique N° :14. Office International de l'Eau SNIDE.71p.

16. **Berthold A., Cremer K., Kreuter J. (1996).** Preparation and caracterization of chitosan microspheres as model for anti-inflammatory drugs. Journal of Controlled Release. 39(1): 17-25.

17. **Beveridge T.J. (2001).** Use of the gram stain in microbiology. Biotechnic and Histochemistry. 76(3): 111-118.

18. **Bhavani K., Ara Begum E.R., Selvakumar S., Shenbagarathai R. (2016).** Chitosan A Low Cost Adsorbent for Electroplating Waste Water Treatment. Journal of Bioremediation & Biodegradation. **7**(3): 1-6.

19. **Bouauine O. (2018).** Caracterisation et valorisation de bioressources végétales pour le prétraitemet d'effluents par coagulation –floculation. thèse de doctorat : Sciences et génie de l'environnement. Université Sidi Mohamed Ben Abdallah (Maroc) et l'Université de Limoges.

20. **Boucherdoud A., Bestani B., Benderdouche N., Duclaux L. (2019).** The use of calcium alginate-activated carbon composite material in fixed-bed columns for methylene blue removal from wastewater. Desalination Water Treatment. 154: 356-368.

21. **Brémaud C., Claisse J.-R., Leulier F., Thibaut J., Ulrich E. (2006).** Alimentation santé, qualité de l'environnement et du cadre de vie en milieu rural. Educagri Editions. 231p.

22. **Brémaud C., Thibaut J., Ulrich E. (2012).**Environnement, Alimentation, santé. Educagri Editions. 203p.

23. **Brine C.J., Austin R.P. (1981).** Chitin Variability with species and method of preparation. Comparative Biochemistry and Physiology. 69 (2): 283-286.

24. **Brown M. A., De vito S.C. (1993).** Predicing azo dye toxicity. Critical review in Environmental Science and Technology. 23 (3): 249-324.

25. **Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M.,Argüelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo M. (2001).** An Infrared Investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer. 42 (8): 3569-3580.

26. **Bulut E., Özacar M., Şengil İ.A. (2008).** Equilibrium and kinetic data and process design for adsorption of Congo Red onto bentonite. Journal of Hazardous Materials. 154 (1–3): 613–622.

27. **Bulut Y., Karaer H. (2014).** Adsorption of Methylene Blue from Aqueous Solution by Crosslinked Chitosan/Bentonite Composite. Journal of Dispersion Science and Technology. 36 (1): 61–67.

28. **Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M.P., Coquet Y. (2005).** Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole. 637p.

29. **Campbell L.S., Davies B.E. (1995).** Soil sorption of caesium modelled by the Langmuir and Freundlich isotherm equations. Applied Geochemistry. 10 (6): 715–723.

30. **Capon M., Courilleu V., Valette C. (1999).** Chimie des couleurs et des odeurs. Cultures et techniques. 2ème édition. 255p.

31. **Carliell C.M., Barclay S.J., Naidoo N., Buckley C.A., Mulholland D.A., Senior E. (1995).** Microbial decolorization of a reactive azo dye under anaerobic conditions. Water SA. 21 (1): 61–69.

32. **Cartwright R.A. (1983).** Historical and modern epidemiological studies on populations exposed to N-substituted aryl compounds. Environmental Health Perspective. 49: 13-19.

33. **Casadevall A., Martinez L.R. (2007).** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Applied and Environmental Microbiology. 4592- 4601.

34. Cemagref (2011). Pesticides, agriculture et environnement: Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Editions Quae. France. 29p.

35. Chalet C., Damour O., Domard A. (2001). Influence of the degrée of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials. 22 (3): 261-268.

36. Chang C.C., Tseng S.K., Chang C.C., Ho C.M. (2004). Degradation of 2-chlorophenol via a hydrogenotrophic biofilm under different reductive conditions. Chemosphere. 56 (10): 989-997.

37. Chang K.L.B., Tsai G., Lee J., Fu W.R. (1997). Heterogeneous N-desacetylation of chitin in alkaline solution. Carbohydrate Research. 303 (10): 327-332.

38. Chen C.Y., Chen S.D. (2000). Biofilm characteristics in biological denitrification biofilm reactors. Water Science and Technology. 41 (4): 147-154.

39. Chen J.P., Lin M. (2001). Equilibrium and kinetics of metal ion adsorption onto a commercial H-type granular activated carbon: experimental and modelling studies. Water Research. 35 (10):2385-2394.

40. Chen J.P., Gong Y., Gu H.B., Chen W.Y. (2006). Study on the electrochemistry behavior of tanning agent-gelatin in different conditions. Leather Science and Engineering. 16: 15–19.

41. Chen L.M., Chai L.-H. (2005). Mathematical model and mechanisms for biofilm wastewater treatment systems. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21 (8): 1455–1460.

42. Chen Y., Long W., Xu H. (2019). Efficient removal of Acid Red 18 from aqueous solution by in-situ polymerization of polypyrrole-chitosan composites. Journal of Molecular Liquids. 287: 110888.

43. Christensson M., Welander T. (2004). Treatment of municipal wastewater in a hybrid process using a new suspended carrier with large surface area. Water Science and Technology. 49 (11-12): 207- 214.

44. Chu K.H. (2002). Removal of copper from aqueous solution by chitosan in prawn shell: adsorption equilibrium and kinetics. Journal of Hazardous Materials. 90 (1): 77–95.

45. Chuah T.G., Jumasiah A., Azni I., Katayon S., Thomas Choong S. Y. (2005). Rice husk as a potentially low-cost biosorbent for heavy metal and dye removal: an overview. Desalination. 175 (3): 305-316.

46. Chung K.T., Cerniglia C.E. (1992). Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships. Mutation Research. 277 (3): 201-220.

47. Chung K.T., Fluk G.E., Andrews A.E. (1981). Mutagenicity testing of some commonly used dyes. Applieds and Environmental Microbiology. 42 (4): 641-648.

48. Clarke A.E., Anliker R. (1980). Organic dyes and pigments. The handbook of environmental chemistry. 3: 181-215.

49. Clutterbuck A.L., Woods E.J.,KnottenbeltD.C., CleggP.D., CochraneC.A., PercivalS.L. (**2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. Veterinany Microbiology. 121 (1-2): 1-17.

50. Coles C.A., Yong R.N. (2006). Use of equilibrium and initial metal concentrations in determining Freundlich isotherms for soils and sediments. Engineering Geology. 85 (1–2): 19–25.

51. Comte.S., Guibaud G., Baudu M. (2008). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. J Hazard Mat 151:185–193.

52. Crini G., Badot P.M. (2007). Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique.Presses universitaires de Franche-Comité. Paris. 15-62 pp.

53. Crini G. (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. Progress in Polymer Science. 30(1): 38-70.

54. Crini G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. Bioresource Technology. 97 (9): 1061-1085.

55. Crini G. (2008). Kinetic and equilibrium studies on the removal of cationic dyes from aqueous solution by adsorption onto a cyclodextrin polymer. Dyes Pigments. 77 (2): 415–426.

56. Czechowska-Biskup R., Wach R. A., Rosiak J.M., Ulański P. (2018). Procedure for determination of the molecular weight of chitosan by viscometry. Progress on Chemistry and Application of *Chitin and its* Derivatives. XXIII: 45–54.

57. Dada A.O., Olalekan A.P, Olatunya A.M., DADA O. (2012). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn^{2+} Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk. Journal of Applied Chemistry. 3 (1): 38–45.

58. **Darvishi Cheshmeh Soltani R., Khataee A.R., Safari M., Joo S.W. (2013).** Preparation of bio-silica/chitosan nanocomposite for adsorption of a textile dye in aqueous solutions. International Biodeterioration and Biodegradation. 85: 383–391.

59. **Das T., Sehar S., Manefield M. (2013).** The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. Environmental Microbiology Reports. 5 (6):778–786.

60. **De Chalvet De Rochemonteix A. (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse de Doctorat vétérinaire: Médecine de Créteil. Paris: École Nationale Vétérinaire D'Alfort.141p.

61. **Deepa C.N. et Suresha S. (2014).** Biosorption of Ni(II) inAqueous Solution and Industrial Wastewater by Leaves of Araucaria cookie. International Journal of Research in Chemistry and Environment. 4(4): 101-108.

62. **Desbrières J. (2002).** La chimie des substances renouvelables: Chitine et chitosane.L'actualité chimique. Paris. 39-44p.

63. **Desta M.B. (2013).** Batch Sorption Experiments: Langmuir and Freundlich Isotherm Studies for the Adsorption of Textile Metal Ions onto Teff Straw (Eragrostis tef) Agricultural Waste. Journal of Thermodynamics. 2013: 1–6.

64. **Domard A., Piron E. (2000).** Recent approach of metal binding by chitosan and derivatives. Advances in Chitin science. (4): 295-301.

65. **Domard A., Rinaudo M. (1983).** Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 5(1): 49–52.

66. **Domszy, J. G., & Roberts, G. A. F. (1985).** Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. Macromolecular Chemistry, 186(8), 1671-1677.

67. **Donlan R.M., Costerton J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 15: 167-193.

68. **Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial life on surface. Emerging Infectious Diseases. 8 (9): 881-890.

69. **Dos Anjos F.S.C., Vieira E. F. S., Cestari A.R.(2002).** Interaction of Indigo Carmine Dye with Chitosan Evaluated by Adsorption and Thermochemical Data. Journal of Colloid Interface Science. 253(2): 243–246.

70. DuBois M., Gilles K.A., Hamilton K.J., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28 (3): 350-356.

71. Ekkalak P., Saipin C.(2014). Production of High Viscosity Chitosan fromBiologically Purified Chitin Isolated by Microbial Fermentation and Deproteinization. International Journal of Polymer Science ID 162173, doi.org/10.1155/2014/162173

72. El-Aassar A.H.M. (2012). Polysulfone-Polyvinyl Alcohol Thin Film Nano-Composite Membranes: Synthesis, Characterisation and Application for Desalination of Saline Groundwater. Journal of Applied Science Research. 8: 3811- 3822.

73. Elayaperumal G., Sathyapriya B., Chinnathambi V. (2018). Extraction and Characterization of Chitosan Nanoparticle from Clarias gariepinus (Catfish) and Its Potential Application as Bio-Adsorbent in Wastewater Treatment from Textile Industrial Effluents. JSM Nanotechnology & Nanomedicine. 6 (3): 1070.

74. Environnement Poitou-Charentes(2015). L'eau. ORE.350p.

75. Falizi N.J., Hacıfazlıoğlu M.C., Parlar İ., Kabay N., Pek T.Ö., Yüksel M.(2018). Evaluation of MBR treated industrial wastewater quality before and after desalination by NF and RO processes for agricultural reuse. Journal of Water Process Engineering. 22: 103–108.

76. Fan L., Luo C., Sun M., Li X., Qiu H. (2013). Highly selective adsorption of lead ions by water-dispersible magnetic chitosan/graphene oxide composites. Colloid and Surface B: Biointerfaces. 103: 523–529.

77. Faurie C., Erra C., Médorie P., Devane J., Remptime J.L. (2012).Écologie*: Approche scientifique et pratique.* 6ème édition. Lavoisier. 450p.

78. Fazeli M., Renata A.S.(2019). Preparation and characterization of starch compositeswith cellulose nanofibers obtained by plasma treatment and ultrasonication. J.Plasma Process and Polymers .e1800167.

79. Foo K.Y., Hameed B.H. (2010). Insights into the Modeling of Adsorption Isotherm Systems. Chemical Engineering Journal. 156 (1): 2–10.

80. Freundlich H. (1906). Oberflächeneinflüsse beim Bler und bei der Bierbereitung, Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide. 1 (5): 152–152.

81. Ganesh R(1992). Fate of azo dye in sludges .These de doctorat , Chmie ,Virginia polytechnic institute and state University ,Blacksburg,VA,USA,193p.

82. Ganesh R.,BoardmanG.D., Michelsen D. (1994). Fate of azo dye in sludges. Water researche. 28 (6): 1367-1376

83. Gaujous D., (1995). La pollution des milieux aquatique: Aide mémoire. 2éme édition. Lavoisier Tec & Doc. Paris. 220p.

84. Gerente C., Lee V.K.C., Le Cloirec P., McKay G. (2007). Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption Mechanisms and models review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 37 (1): 41-127.

85. Gilli E., Mangan C., Mudry J. (2008). Hydrogéologie: Objets, méthodes, applications. 2éme édition. Dunod: Paris. 352p.

86. Girao A.V., Caputo G., Marta C.F.(2017). Application of scanning Electron Microscopy –Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDS).Comprehensive Analytical Chemistry .Vol.75.

87. Golovlev E.L. (2002). The mechanism of formation of Pseudomonas aeruginosa biofilm, a type of structured population. Mikrobiologiia. 71 (3): 293-300.

88. Goudet P., Kowalski A. (2011). Physique et Chimie: 1er et terminale bac pro. Educagri Editions: Dijon. 288p.

89. Graham C., Los A. (2007). Encyclopedia of Cancer and Society. Sage Publications Inc. 695-697p.

90. Greene J.C., Baughman G.L. (1996). Effects of 46 dyes on population growth of freshwater green alga Selenastrum capricornutum. Textile Chemistry and Coloristry. 28 (4): 23-30.

91. Guibaud G., Van Hullebusch E., Bordas F. (2006). Lead and cadmium biosorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludges: pH-sorption edge tests and mathematical equilibrium modelling. Chemosphere. 64 (11): 1955-1962.

92. Guivarch E.(2004). Traitement des polluants organiques en milieux aqueux par le procédé électrochimique d'oxydation avancée «Electro-Fenton»: Application à la minéralisation des colorants synthétiques. Thèse de doctorat: Chimie. Paris: Université de Marnela-Vallée. 232p.

93. Gupta D.B. (1992). The importance of water resources for urban socioeconomic development. International Conference on Water and the Environment. *5:1-19.*

94. Gupta S.S. et Bhattacharyya K.G. (2006). Adsorption of Ni(II) on clays. Journal of Colloid and Interface Science. 295 (1): 21-32.

95. Gupta V.K., Suhas (2009). Application Of Low-Cost Adsorbents For Dye Removal - A Review. Journal Of Environmental Management. 90: 2313-2342.

96. Gyliené O., NivinsKiené O.,Vengris T. (2008). Sorption of tartrate, citrate, and EDTA onto chitosan and its regeneration applying electrolysis. Carbohydrate Research. 343 (8): 1324-1332.

97. Hall K. R., Eagleton L. C., Acrivos A., Vermeulen T. (1966). Pore- and Solid-Diffusion Kinetics in Fixed-Bed Adsorption under Constant-Pattern Conditions. Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals. 5 (2): 212–223.

98. Hashimoto W., Murata K. (1998). Alpha-L-rhamnosidase of Sphingomonas sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 62 (6):1068–1074.

99. Heukelekian H., Heller A. (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. J Bacteriol40: 547–558.

100. Hitz H.R., Huber W., Reed R.H. (1978). The Adsorption of Dyes on Activated Sludge. Journal of the Society of Dyers and Colourists. 94 (2): 71-76.

101. Ho Y., McKay G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. Process Biochemistry. 34 (5): 451–465.

102. Hodson M.E. (2004). Heavy metals--geochemical bogey men. Environmental Pollution. 129 (3): 341- 343.

103. Hoiby N. (2014). A Personal history of Research on Microbial Biofilms and Biofilm Infections. Pathogens Disease. 70 (3): 205-211.

104. Hokkanen S., Repo E., Westholm L.J., Lou S., Sainio T., Sillanpa M.(2014). Adsorption of Ni^{2+}, Cd^{2+}, PO_4^{3-} and NO_3^- from aqueous solutions by nanostructured microfibrillated cellulose modified with carbonated hydroxyapatite. Chemical Engineering Journal. 252: 64–74.

105. Hosseini S.F., Zandi M., Rezaei M., Farahmandghavi F.(2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. Carbohydrate Polymers. 95:50–56.

106. Huang X-Y., Bin J-P., Bu H-T., Jiang G-B., Zeng M.-H. (2011). Removal of anionic dye eosin Y from aqueous solution using ethylenediamine modified chitosan. Carbohydrate Polymers. 84 (4): 1350–1356.

107. Huynh T.M.D (2009). Impact des métaux lourds sur les interactions plante/ ver de terre/microflore tellurique. Thèse doctorat: Ecologie Microbienne. Paris: Université Paris-Est. 145p.

108. Ibezim E.C., Andrade C.T., Marcia C., Barretto B., Odimegwu D.C., De Lima F.F. (2011). Ionically cross-linked chitosan/TPP microparticles for the controlled delivery of pyrimethamine. Ibnosina J Med BS. 3:77–88.

109. Ifen (2004). L'épuration des eaux usées urbaines. Les données de l'environnement. N°98.4p.

110. Ifen (2007). Analyse Statistique et Cartographique de l'Erosion Marine. Rapport N°6. 39p.

111. Ifremer (2008). Institut français de recherhce pour l'exploitation de la mer http://envit.ifremer.fr/infos/glossaire /p/polluant

112. İlgü H., Turan T.,Şanli-Mohamed G. (2011). Preparation, Characterization and Optimization of Chitosan Nanoparticles as Carrier for Immobilization of Thermophilic Recombinant Esterase. Journal of Macromolecular Science Part A. 48:713–721.

113. Jalal Z.M.M. (2005). Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization. Iranian Polymer Journal. 14 (3): 235-265.

114. Janikowski T.B., Velicogna D., Punt M., Daugulis A.J. (2002). Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a Sphingomonas sp. Applied Microbiology and Biotechnology. 59 (2-3): 368– 376.

115. Jawad A.H., Malek N. N.A., Abdulhameed A.S., Razuan R. (2020). Synthesis of Magnetic Chitosan-Fly Ash/Fe_3O_4 Composite for Adsorption of Reactive Orange 16 Dye: Optimization by Box–Behnken Design. Journal of Polymers and the Environment. 8 (3): 1068–1082.

116.Je J.Y., Ahn C.B. (2010). Antihypertensive Actions of Chitosan and Its Derivatives: Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives. Biological Activities and Applications. Landon. 263-270p.

117. Jeng H. (2007). Encyclopedia of Cancer and Society. Ed. Graham Colditz. , Los Angeles: Sage Publications Inc. **2**: 695-697.

118.Jeppsson U. (1996). Modelling Aspects of Wastewater Treatment Processes. Thèse: Department of Industrial Electrical Engineering and Automation (IEA). Lund Institute of Technology (LTH). Lund University: Sweden. 428p.

119.Jiang X., Chen L., Zhong W. (2003). A new linear potentiometric titration method for the determination of desacetylation degré of chitosan. Carbohydrate Polymers .54 (4): 457-463.

120.Jin G. et Englande A.J. (1998). Carbon tetrachloride biodegradation in a fixed-biofilm reactor and its kinetic study. Water Science and Technology. 38 (8-9): 155-162.

121. Jumadi J., Kamari A., Rahim N.A., Wong S.T.S., Yusoff S., Ishak S., Abdulrasooland S. et Kumaran S. (2019). Removal of methylene blue and congo red by magnetic chitosan nanocomposite: Characterization and adsorption studies . J. Phys.: Conf. Ser.1397 012027 .

122.Jung R., Steinle D., Anliker R. (1992). A compilation of genotoxicity and carcinogenicity data on aromatic aminosulphonic acids. Food Chemical Toxicology. 30 (7): 635-660.

123.Kaloti M., Bohidar H.B. (2010). Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan-sodium tripolyphosphate solutions. Colloids Surface B. 81 (1):165–173.

124.Kassai M.R. (2007). Calculation of Mark –Houwink-Sakurada (MHS)equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. Carboohydrate Polymers. 68 (3): 477-488.

125.Khan T.A., Peh K.K., Ch'ng H.S. (2000). Mechanical bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for wound dressing. Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Science. 3 (3): 303-311.

126.Khor E., Lim L.Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials. 24(13): 2339-2349.

127.Kim S.K., Jung, W.K. (2010). Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives on Human Hemostasis: Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives. Biological Activities and Applications, Paris. 251-262p.

128.King E.O., Wood M.K., Raney D.E. (1954). Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 44: 301-307.

129.Koukaras E.N., Papadimitriou S.A., Bikiaris D.N., FroudaKis E.G. (2012). Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. Molecules Pharmaceutiss. 9 (10): 2856–2862.

130.Krajewska B. (2005). Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. Separation and Purification Technology. 41 (3): 305-312.

131.Kucukgulmez A., Celik M., Yanar Y., Ersoy B., Cıkrıkcı M.(2006). Effects of different cooking methods on the proximate composition and mineral contents of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Adv Food Sci.28(4):223–227.

132.Kumar S.P., Ramakrishnan K., Kirupha S.D., Sivanesan S. (2010). Thermodynamic and kinetic studies of cadmiumadsorption from aqueous solution onto rice husk. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 27 (2): 347–355.

133.Kumar U., Bandyopadhyay M. (2006). Sorption of Cadmium From Aqueous Solution Using Pretreated Rice-Husk. Bioresource Technology. 97: 104-109.

134.Kurita K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. Marine Biotechnology. 8 (4): 203-226.

135.Lafleur C., Fortier J., Kharoune L., Kharoune M. (2008). Évaluation d'un procédé de coagulation-floculation au chitosane pour l'enlèvement du phosphore dans les effluents piscicoles. Rapport commandité par la SODIM. N°: 710.149. Université du Québec: école de technologie superieure. 41p.

136.Lagergren S. (1898). About the theory of so-called adsorption of soluble substances. Kungl Svenska Vetenskapsakad Handl. 24 (4): 1–39.

137.Lakherwal D., Rattan V.K., Singh H.P. (2016). Studies on Adsorption of Nickel by Activated Carbon in a Liquid Fluidised Bed Reactor. Canadian *Chemical* Transactions. 4: 121-132.

138.Lakshmipathy R., Sarada N.C. (2015). Methylene blue adsorption onto native Water melonrind: batch and fixed bed column studies. Desalination and Water Treatment. 57 (23): 1–14.

139.Lameiras S., Quintelas C., Tavares T. (2008). Biosorption of Cr (VI) using a bacterial biofilm supported on granular activated carbon and on zeolite. Bioresource Technology. 99: 801–806.

140.Langmuir I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. Journal of American Chemical Society. 40 (9): 1361–1403.

141.Larpent J.P., Larpent G.M. (2007).Mémento technique de microbiologie : micro-organismes eucaryotes et procaryotes : structure, métabolisme, systématique, applications industrielles, milieux de culture et réactifs . 3e Edition .Tec et Doc-Lavoisier .Paris .1Vol.(VIII-1039p).

142.Lazarova V., Manem J. (2000). Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment. In Bryers J.D. Biofilms II: process analysis and applications. New York, Wiley-Liss. 159-206p.

143.Lee S.T., Mi F.L., Shen Y.J., Shyu S.S. **(2001)**. Equilibrium and kinetic studies of copper (II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. Polymers. 42: 1879-1892.

144.Lima R., Feitosa L.O., Fraceto L., Anderson D.E.S.P., Aouada F.(2011). Evaluation of Gentoxicity of chitosan nanoparticules for use in food packaging Films.Journal of Food Science 75(6):N89-96.

145.Lindberg C.F. (1997). Control and estimation strategies applied to the activated sludge process. Thèse: Department of Materials Science Systems and Control Group. Uppsala University: Sweden. 214p.

146.Lipatova I. M., Makarova L.I., Yusova A.A. (2008). Adsorption removal of anionic dyes from aqueous solutions by chitosan nanoparticles deposited on the fibrous carrier. Chemosphere. 212: 1155–1162.

147.Little L.W., Chillingworth M.A. (1974). in Reports on selected dyes and their effect. Editor : American Dye Manufacturers Institute. New York.

148.Liu H., Fang H.P. (2002). Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. Biotechnology and Bioengineering. 80 (7): 806–811.

149.Lobas D., Schumpe S., Deckwer W.D. (1992). The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonaspaucimobilis* E2 (DSM 6314). Applied Microbiology and Biotechnology. 37:411–415

150.López C., Valade A.G., Combourieu B., Mielgo I., Bouchon B., Lema J.M. (2004). Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ 1H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. Analytical Biochemistry. 335 (1): 135–149.

151.Malek N.N. A., Jawad A.H., Abdulhameed A.S., Ismail K., Hameed B.H. (2020). New magnetic Schiff's base-chitosan-glyoxal/fly ash/Fe_3O_4 biocomposite for the removal of anionic azo dye: An optimized process. International Journal of Biological Macromolecules. 146: 530-539.

152.Martinez L.R., Casadevall A. (2007). Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Applied and Environmental Microbiology.73 (14): 4592-601.

153.Martins L.O., Fialho A.M., Rodrigues P.L., SáCorreia I. (1996). Gellan gum production and activity of biosynthetic enzymes in *Sphingomonas paucimobilis* mucoid and non-mucoid variants. Biotechnology and Applied Biochemistry. 24: 47–54.

154.Martins M.A.M., Lima N., Silvestre A.J.D., Queiroz M.J. (2003). Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. Chemosphere. 52: 967–973.

155.Mathure N.K., Narang C.K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animais. Journal of Chemical Education. 67 (11): 938-942.

156.Matis K.A., Zouboulis A. (1994). Flotation of cadmium-loaded biomass. Biotechnology Bioengineering. 44 (3): 354-360.

157.Mayet J. (1994). La pratique de l'eau, Traitements aux points d'utilisation, le Moniteur. 2ème Edition. Paris. 382p.

158.Méot B., Alamy Z. (1999). Les eaux usées: urbaines régulementation des rejets urbaines, traitement de finition par géoépuration. BRGM. France. 99p.

159.Mi F.A., Shyu S.S., Lee S.T., Wong T.B. (1999). Kinetic study of chitosan tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan tripolyphosphate gel beads prepared by in liquid curing method. Journal of Polymers Science Part B. 37 (14): 1551–1564.

160.Milán Z., Sánchez E., Borja R., Weiland P., Cruz M. (2001). Synergistic effects of natural and modified zeolites on the methanogenesis of acetate and methanol. Biotechnology Letters. 23 (7): 559–562.

161.Miquel G. (2001). Rapport sur les Effets des Métaux Lourds sur l'Environnement et la Santé. Assemblée Nationale Française. N°2979. Paris. 366p.

162.Mohamed R., Murshid I., Tarun M. (2014). Determination of Degrée deacetylation of Chitosan and their effect on the release behavior of essential Oilfrom chitosan and chitosan gelation complex microcapsules .International of Advanced Engineering Applications,Vol2,Iss4,pp4.

163.Mohanasrinivasan V., Mishra M., Paliwal J. S., Singh S. K., Selvarajan E., Suganthi V., Subathra Devi C. (2013). Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. 3 Biotech. 4 (2): 167–175.

164.Monnet-Tschudi F., Zurich M.G., Boschat C., Corbaz A., Honegger P. (2006). Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. Reviews Environmental Health. 21 (2): 105-117.

165.Moorjani M.N., Achutha V., Khasim D.I. (1975). Parameters afecting the viscosity of chitosan from prawn waste. Journal of Food Science and Technology. 12: 187-189.

166.Muzarrelli R.A.A.(1995). Chitosan–Based dietary foods. Journal of Carbohydrate Polymers .Volume 9 , Issue 4: 309-316.

167.Muzarrelli R.A.A., Muzarrelli B. (1986). Structural and functional versatility of chitins: In Structural diversity and functional Versatility of Polysaccharides, Dumitriu S.1erédition. Marcel Dekker. New York. 569-594p.

168.Muzzarelli R.A. (2010). Chitosan Scaffolds for Bone Regeneration: In Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, Kim S.K.1eredition. Biological Activities and Applications. 223- 240p.

169.Naja G., Volesky B. (2006). Behavior of the mass transfer zone in a biosorption column. Environment and Science Technology. 40: 3996–4003.

170.Nam K. S., Kim M. K., Shon Y.H. (2007). Chemopreventive effect of chitosan Oligosaccharide against colon carcinogenesis. Journal of Microbiology and Biotechnology. 17 (9): 1546-1549.

171.No H.K., Meyers S.P. (1995). Preparation and characterization oh chitin and chitosan. Journal of aquatic Food Product Technology. 4 (2): 27-52.

172.No H. K., Meyers S.P., Lee K.S. (1989). Isolation and characterization of chitin from craw ash shell wast. Journal of Agricultural and Food Chemitry. 37 (3): 575-579.

173.No H.k., Nah J.W., Meyers S. P. (2000). Application of Chitosan for Treatement of WasteWaters. Review of Environmental Contamination and toxicology. 163: 1-28.

174.No H.K., Nah J.W., Meyers S.P. (2003). Effect of time /temperature treatement parameters on depolymerization of chitosan. Journal of Applied Polyùmer science. 87 (12): 1890-1894.

175.NT 106.02. (1989).INNORPI (Institut National Tunisien de la Normalisation et de la Proprietés Industrielle) .Normes de Rjet dans un milieu Hydrique .

176.Olteanu C., Enescu D. (2007). Chitosan involved in tissue engineering and regenerative medicine. Room Biotechnol Lett :12:3217-33.

177.O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual Review Microbiology. 54 (1): 49-79.

178.Ødegaard H., Gisvold B., Strickland J. (2000). The influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process. Water Science and Technology. 41 (4-5): 383-391.

179.Onsoyen E., Skaugrud O. (1990). Metal recovery using chitosan. Journal Of Chemical Technologie And Biotechnologie. 49 (4): 395-404.

180.Özcan A., Şahin Y., Koparal A.S., Oturan M.A. (2008). Degradation of picloram by the electro-Fenton process. Journal of Hazardous Materials. 153 (1-2): 718-727.

181.Oztürk A., Artan T., Ayar A. (2004). Biosorption of nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solution by Streptomyces coelicolor A3(2). Colloids Surface B. 34: 105-111.

182.Pagga U., Taeger K. (1994). Development of a method for adsorption of dyestuffs on activated sludge. Water Resreach. 28 (5): 1051-1057.

183.Pang J., Liu X., Zhang X., Wu Y., Sun R. (2013). Fabrication of Cellulose Film with Enhanced Mechanical Properties in Ionic Liquid 1-Allyl-3-methylimidaxolium Chloride (AmimCl). Materials Basel. 6 (4): 1270-1284.

184.Parkar S.G., Flint S.H., Palmer J.S., Brooks J.D. (2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. Journal of Applied Microbiology. 90 (6): 901–908.

185.Percot A., Viton C., Domard A. (2003). Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. Biomacromolecules. 4 (1): 12–18.

186.Phattaranawik J., Jiraratananon R., Fane A.G. (2003). Heat transport and membrane distillation coefficients in direct contact membrane distillation. Journal of Membrane Science. 212 (1-2): 177–193.

187.Phinichka N., Kaenthong S. (2017). Regenerated cellulose from high alpha cellulose pulp of steam-exploded sugarcane bagasse. Journal of Materials Research and Technology. 7:55–65.

188.Piron E., Accominotti M., Domard A. (1997). Interaction between chitosan and uranyl ions: Role of physical and physico-chemical parameters on the kinetics sorption. Langmuir. 13 (6):1653-1658.

189.PNUE (1991). Pollution des eaux douces. Bibliothèque de l'environnement PNUE/GEMS. Nairobi. N° 6.

190.Provost F., Laurent F., Camachouz categeri L.R., Boiron P. (1997). Molecular Study of persistence of Nocardia asteroides and Nocardia otitidiscaviarum strains in patients with long-term nocardiosis. Journal of Clinical Microbiology. 35 (5): 1157-1160.

191.Putra W.P., Kamari A., Najiah S., Yusoff M., Ishak C.F., Mohamed A., Hashim N., Isa I.Md. (2014). Biosorption of Cu(II), Pb(II) and Zn(II) Ions from Aqueous Solutions Using Selected Waste Materials: Adsorption and Characterisation Studies. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences. 4 (4): 25-35.

192.Quintelas C., Rocha Z., Silva B., Fonseca B., Figueiredo H., Tavares T. (2009). Biosorptive performance of an *Escherichia coli* biofilm supported on zeolite NaY for the removal of Cr(VI), Cd(II), Fe(III) and Ni(II). Chemical Engineering Journal. 152 (1): 110–115.

193.Quist-Jensen C.A., Macedonio F., Drioli E. (2015). Membrane technology for water production in agriculture: Desalination and wastewater reuse. Desalination. 364: 17–32.

194.Rahali A., Riazi A.,Boucherdoud A.;Moussaoui B.,Nihal B(2020). Decolourisation Of Methylene Blue And Congo Red Dye Solutions By Adsorption Using Chitosan.Desalination and Water treatement **.**198 (1499-3994).

195.Rahmi I., Irfan M. (2019). Methylene blue removal from water using H2SO4 crosslinked magnetic chitosan nanocomposite beads. Microchemistry Journal. 144: 397–402.

196.Ramade F. (2007). Introduction à l'écotoxicologie: fondements et applications. Editions Tec&`Doc, Lavoisier. Paris. 618p.

197.Ramade F. (2011). Introduction à l'écotchimie: Les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. Editions Tec&`Doc, Lavoisier. Paris. 828p.

198.Rangabhashiyam S., Anu N., Selvaraj N. (2013). Sequestration of dye from textile industry wastewater using agricultural waste products as adsorbents. Journal of Environmental Chemical Engineering. 1 (4): 629–641.

199.Ravi Kumar M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers. 46 (1): 1-27.

200.Relman D.A., Loutit J.S., Schmidt T.M., Falkow S., Tompkins L.S. (1990). The agent of bacillary angiomatosiq an approach to the identification of uncultured pathogen. The New England Journal of Medicine. 323 (23): 1573-1580.

201.Renault F., Sancey B., Charles J., Morin-Crini N., Badot P.M., Winterton P., Crini G.(2009). Chitosan flocculation of cardboard-mill secondary biological wastewater. Chemical Engineering Journal. 155 (3): 775-783.

202.Ribeiro M. P., Espiga A., Silva D., Batista P. (2009). Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. Wound repair and regeneration. 17 (6): 817-824.

203.Rice A.R., Hamilton1 M.A., Camper A.K. (2000). Apparent Surface Associated Lag Time in Growth of Primary Biofilm Cells. Microbial Ecology. 41:8-15.

204.Rinaudo C., (1993). Le théâtre Lino Ventura. Évaluation sociale et étude d'impact. Rapport d'étude. Nice: A.R.E.S.

205.Rinaudo M.,Pavlov G.,Desbrieres J.,(1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan . Polymers ,40,7029,7032.

206.Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science (Oxford). 31: 603-632.

207.Roberts G.A.F. (1992). Chitin chemistry.1er edition. Macmillan. London. 350p.

208.Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology. 77: 247-255.

209.Rodgers M., Zhan X.M. (2003). Moving-Medium Biofilm Reactors. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 2 (2): 213-224.

210.Rosén M., Welander T., Löfqvist A., Holmgren J. (1998). Development of new process for treatment of pharmaceutical waste water. Water Science and Technology. 37 (9): 251-258.

211.Rosenkranz H.S., Klopman G. (1990). Structural basis of the mutagenicity of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes. Mutagenesis. 5 (2): 137-146.

212.Saari H., Fuentes C., Sjöö M., Rayner M., Wahlgren M. (2017). Production of starch nanoparticles by dissolution and non-solvent precipitation for use in food-grade Pickering emulsions. Carbohydrate Polymers. 157: 558–566.

213.Sagheer F.A.A., Al-Sughayer M.A., Muslim S., Elsabee M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. Carbohydrate Polymers. 77 (2): 410–419.

214.Saha T.K., Karmaker S., Ichikawa H., Fukumori Y. (2005). Mechanisms and kinetics of trisodium 2-hydroxy-1,1′-azonaphthalene-3,4′,6-trisulfonate adsorption onto chitosan. Journal of Colloid Interface Science. 286(2): 433–439.

215.Sakkayawong N., Thiravetyan P., Nakbanpote W. (2005). Adsorption mechanism of synthetic reactive dye wastewater by chitosan. Journal of Colloid and Interface Science. 286 (1): 36–42.

216.Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A.(1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature. 265:687–695.

217.Sandford P.A. (1989). Chitosan: Commercial Uses and Potential Applications, In Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. 1er edition. Elsevier Applied Science. London. 51-69p.

218.Sani R.K., Banerjee U.C. (1999). Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dyestuff effluent by *kurthia sp*. Enzyme and Microbial Technology. 24 (7): 433-437.

219.Sari A., Tuzen M., Uluozlu O.D., Soylak M. (2007). Biosorption of Pb(II) and Ni(II) from aqueous solution by lichen (*Cladonia furcata*) biomass. Biochemistry and Engineering Journal. 37: 151–158.

220.Servais P. (1999). La matière organique dans les milieux naturels. Presse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées. 49p.

221.Shahidi F., Abuzaytoun R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. Advances Food and Nutrition Research. 49: 93-135.

222.Shekarforoush E., Mirhosseini H., Amid B.T., Ghazali H., Muhammad K., Sarker M.Z.I., Paykary M. (2016). Rheological Properties and Emulsifying Activity of Gum Karaya (*Sterculia Urens*) in Aqueous System and Oil in Water Emulsion: Heat Treatment and Microwave Modification. International Journalof Food Properties. 19 (3): 662–679.

223.Shen Y., Li L., Xiao K., Xi J. (2016). Constructing Three-Dimensional Hierarchical Architectures by Integrating Carbon Nanofibers into Graphite Felts for Water Purification. ACS Sustainable Chemistry Engineering. 4: 2351−2358.

224.Shih C.M., Shieh Y.T., Twu Y.K.(2009). Preparation and Characterization of cellulose/chitosan blend films. Carbohydrate Polymers. 78 (1): 169-174.

225.Shroff K.A., Vaidya V.K. (2011). Effect of pre-treatments on biosorption of Ni(II) by dead biomass of Mucor hiemalis. Engineering in Life Sciences. 11 (6): 588–597.

226.Simate G.S., Cluett J., Iyuke S.E., Musapatika E.T., Ndlovu S., Walubita L.F., Alvarez A.E. (2011). The treatment of brewery waste for reuse: state of the art. Desalination. 273 (2-3): 235-247.

227.Simon J.C., Dauby B., Nonet S. (2008). Evaluation de l'efficacité de l'oxydation avancée par photocatalyse hétérogène UV/TiO2 sur un effluent industriel contaminé par des composés organiques non biodégradables (colorants). Revue Scientifique des ISILF n°22. 25p.

228.Singh R., Paul D., Jain R.K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. Trends Microbiology. 14 (9): 389-397.

229.Singh V.K., Soni A.B., Singh R.K. (2017). Comparative study of central composite and Box-Behnken design for the optimization of malachite green dye adsorption onto Sal seed activated char. Journal of Environment Biology. 38 (5): 849–858.

230.Soltani R.D.C., Khataee A.R., Safari M., Joo S.W. (2013). Preparation of bio-silica/chitosan nanocomposite for adsorption of a textile dye in aqueous solutions. International Biodeterioration and Biodegradation. 85: 383–391.

231.Späth R., Flemming H.C., Wuertz S. (1998). Sorption properties of biofilms. Water Science and Technology. 37 (4-5): 207-210.

232.Specht K., Platzek T. (1995). Textile dyes and finishes - Remarks to toxicological and analytical aspects. Deut. Lebensm.-Rundsch. 91 (11): 352-359.

233.Spence J.C.H. (2013). High-Resolution Electron Microscopy. 4ème édition. Oxford University Press. New York. 432p.

234.Spormann AM. (2008). Physiology of Microbes in Biofilms: In Bacterial Biofilms, Remeo T. Current Topics in Microbiology and Immunology. USB. 17-36p.

235.Sreejalekshmi K.G., Krishnan K.A., Anirudhan T.S. (2009). Adsorption of Pb(II) and Pb(II)-citric acid on sawdust activated carbon: kinetic and equilibrium isotherm studies. Journal of Hazardous Materials. 161 (2–3):1506–1513.

236.Stanley Nicola R., Lazazzera Beth A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Molecular Microbiology. 52 (4): 917–924.

237.Stellman J.M. (2000). Encyclopédie de sécurité de santé au travail. Bureau Internationale de Travail. 3ème édition. Genève. 4838p.

238.Stephenson D. et Stephenson T. (1992). Bioaugmentation for anhancing biological wastewater treatment. Biotechnological advances. 10 (4): 549-559.

239.Sutherland I. (2001(a)). Biofilm Exopolysaccharides : A strong and Sticky Framework. Microbiology. 147: 3-9.

240.Sutherland I.W. (2001(b)). The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology. 9: 222-227.

241.SuyatmaN.E.(2006). Développement de films biodégradables à base de chitosane: Etude du mélanges chitosane/PLA, de la plastification et de compatibilisation. Thèse de doctorat: Chimie des matériaux. Université de Reims.

242.Taboada E., Cabrera G., Cardenas G. (2003). Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. Journal of Chilean Chemical Society. 48: 7–12.

243.Talaat H.A., El Defrawy N.M., Abulnour A.G., Hani H.A., Tawfik A. (2011). Evaluation of heavy metals removal using some Egyptian clay. IPCBEE.6:37–42.

244.Tamburini A., Pitò P., Cipollina A., Micale G., Ciofalo M. (2013). A Thermochromic Liquid Crystals Image Analysis technique to investigate temperature polarization in spacer filled channels for Membrane Distillation. Journal of Membrane Science. 447: 260–273.

245.Tang Z.X., Qian J.Q., Shi L.E. (2007). Preparation of Chitosan Nanoparticles as Carrier for Immobilized Enzyme. Applied Biochemistry and Biotechnology. 136: 77–96.

246.Tayel A.A., Moussa S., Opwis K., Knittel D., Schollmeyer E., Nickisch-Hartfiel A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 47: 10-14.

247.Theydan S.K., Ahmed M.J. (2012). Adsorption of methylene blue onto biomass-based activated carbon by $FeCl_3$ activation: Equilibrium, kinetics, and thermodynamic studies. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 97: 116-122.

248.Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A. (2003). Contribution to the preparation of chitin and chitosan with controlled physico-chemical properties. Polymer. 44 (26): 7939-7935.

249.Tunali S., Çabuk A., Akar T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. Chemistry and Engineering Journal. 115: 203-211.

250.Unuabonah E.I., Adebowale K.O., Olu-Owolabi B.I. (2007). Kinetic and thermodynamic studies of the adsorption of lead (II) ions onto phosphate-modified kaolinite clay. Journal of Hazardous Materials. 144: 386–395.

251.Van Houdt R., Michiels C. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Resreach Microbiology. 156: 626-633.

252.Van Limbergen H., Top E.M., Verstraete W. (1998). Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 50 (1): 16-23.

253.Varum K.J., Antohonsen M.W., Grasdalen H., Smidsod O. (1991). Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy Carbohydrate Resreach. 211 (1): 17-23.

254.Venceslau M.C., Tom S. et Simon J.J.1994). Characterization of textile wastewaters- a review. Environmental Technology. 15(10): 917-929.

255.Vijayalakshmi K., Devi B.M.,Sudha P.N.,Venkatesan J., Anil S.(2017). Synthesis, Characterization and Applications of Nanochitosan/SodiumAlginate/Microcrystalline Cellulose Film. J.Nanomedicine and Nanotechnology.Vol.7,Iss.6. ISSN 2157-7439.

256.Vishu Kumar A. B., Gowda L. R., Tharanathan R.N. (2004). Non-specific depolymerization of chitosan by promase and characterization of the resultant products. European Journal Biochemistry. 271: 713-723.

257.Wang L., Wang A. (2007). Adsorption characteristics of Congo Red onto the chitosan/montmorillonite nanocomposite. Journal of Hazardous Materials. 147 (3): 979–985.

258.Weber E., Wolfe N.L. (1987). Kinetic studies of the reduction of aromatic azo compounds in anaerobic sediment/water systems. Environmental Toxicology and Technology. 6 (12): 911-920.

259.Weber W.J., Morris J.C. (1963). Kinetics of adsorption on carbon from solutions. Journal of the Sanitary Engineering Division. 89 (2): 31-60.

260.Wilderer P.A., McSwain B.S. (2004). The SBR and its biofilm application potentials. Water Science and Technology. 50 (10): 1-10.

261.Wong K.K., Lee C.K., SLow K., Haron M.J. (2003). Removal of Cu and Pb by tartaric acid modified rice husk from aqueous solutions. Chemosphere. 50 (1): 23-28.

262.Wong, S., Lee, Y., Ngadi, N., Inuwa, I.M., Mohamed N.B.(2018). Synthesis of activated carbon from spent tea leaves for aspirin removal. Chinese Journal of Chemical Engineering. 26 (5): 1003–1011.

263.Wu F., Tseng R., Juang R. (1999). Preparation of activated carbons from bamboo and their adsorption abilities for dyes and phenol. Journal of Environmental Science and Heal Part A. 34 (9): 1753–1775.

264.Yamaguchi T., Ishida M., Suzuki T. (1999). Biodegradation of hydrocarbons by Prototheca zopfii in rotating biological contactors. Process Biochemistry. 35 (3-4): 403-409.

265. Yan-Rung L., Jung-Hao C., Wei-Lun T., Chia-Hung C., Hao-Wu L. (2015). A high efficiency UV-VIS organic photodetector by an invertedPTB7: PC71BM bulk heterojunction structure. IEEE SENSORS. 1-3.

266. Youn D.K., No H.K., Prinyawiwatkul W. (2007). Phyusical charactersitic of decolorized chitosan as affected by sun drying during chitosan preparation . Carbohydrate Polymers 69 (4): 707-712.

267. Yuh-Shan H. (2004). Citation review of Lagergren kinetic rate equation on adsorption reactions. Scientometrics. 59 (1): 171–177.

268. Zhang C., Li X., Pang J. (2001). Synthesis and adsorption properties of magnetic resin microbeads with amine and mercaptan as chelating groups. Journal of applied polymer science. 82 (7): 1587-1592.

269. Zhang N., Qiu H., Si Y., Wang W., Gao J. (2011). Fabrication of highly porous biodegradable monoliths strengthened by graphene oxide and their adsorption of metal ions. Carbon. 49 (3): 827–837.

270. Zhang P., Ding W., Zhang Y., Dai K., Liu W. (2014). Heavy metal ions removal from water using modified zeolite. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 6 (11): 507-514.

271. Zhenwang L., Zhenlu C., Jianyan L. (2000). The PT dye molecular structure and its chromophoric luminescences mechanism. 15th World Conference on Non-DestructiveTesting,15-21p.https://www.ndt.net/article/wcndt00/papers/idn105/idn105.htm

272. Zhu H., Zhang M., Liu Y., Zhang L., Han R. (2012). Study of Congo red adsorption onto chitosan coated magnetic iron oxide in batch mode. Desalination and Water Treatement. 37 (1–3): 46–54.

273. Zilouei H., Soares A., Murto M., Guieysse B., Mattiasson B. (2006). Influence of temperature on process efficiency and microbial community response during the biological removal of chlorophenols in a packed-bed bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology. 72 (3): 591-599.

274. Zobell C.E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity.J Bacteriol. :46:39-56.

275. Zollinger H. (1991). Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 2ème édition. VCH. 512p.

276.Zouboulis A.I., Loukidou M.X., Matis K.A. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. Process Biochemistry. 39: 909–916.

Publication

Desalination and Water Treatment
www.deswater.com
doi: 10.5004/dwt.2020.26093

198 (2020) 422–433
September

Decolourisation of methylene blue and congo red dye solutions by adsorption using chitosan

Abdallah Rahali[a,b], Ali Riazi[b], Badredine Moussaoui[b], Ahmed Boucherdoud[c,*], Nihal Bektaş[d]

[a]*Agronomy department, Institute of Exact Sciences and Sciences of Nature and Life Ahmed Zabana University Center, Relizane – Algeria, email: Rahali28@live.fr (A. Rahali)*
[b]*Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Foods and Health, University of Mostaganem – Algeria, emails: Ardz22003@yafoo.fr (A. Riazi), moussmed@hotmail.fr (B. Moussaoui)*
[c]*Chemistry department, Institute of Exact Sciences and Sciences of Nature and Life Ahmed Zabana University Center, Relizane – Algeria, email: bo-ahmed@live.fr (A. Boucherdoud)*
[d]*Environmental Engineering Department, Gebze Technical University, 41400 Gebze, Turkey, email: bektasn@gmail.com (N. Bektaş)*

Received 21 December 2019; Accepted 8 May 2020

ABSTRACT

Water pollution from industrial discharges is a worldwide problem and can have very harmful effects on the environment. In this study, adsorptive removal of two different dyes was investigated using a new natural, biodegradable adsorbent based on shrimp shells: chitosan in a batch adsorption operating system. Chitosan was synthesized from flowery prawn and then characterized using different analytical techniques. The results obtained show a remarkable removal rate in the first 30 min with optimum process conditions for both dyes. Linear forms of pseudo-first-order, pseudo-second-order kinetic, and the intra-particle diffusion kinetic model equations were used to describe the kinetic data of the dye removal process. The Langmuir and Freundlich adsorption isotherm models were used to analyze equilibrium data of adsorption of dyes by chitosan. The maximum adsorption capacities (Q_m) of chitosan for methylene blue and congo red dye were in the range of 116.3 and 113.6 mg g^{-1}, respectively. The study shows that the dye adsorption process on chitosan can be described as both isotherm models used.

Keywords: Adsorption; Methylene blue; Congo red; Chitosan

* Corresponding author.

1944-3994/1944-3986 © 2020 Desalination Publications. All rights reserved.